

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PRISCILA ROSSI DE BATISTA

***UPREGULATION* DO RECEPTOR TIPO TOLL 4 PELA
ANGIOTENSINA II CONTRIBUI PARA A HIPERTENSÃO ARTERIAL E
DISFUNÇÃO VASCULAR ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

VITÓRIA

2014

PRISCILA ROSSI DE BATISTA

***UPREGULATION* DO RECEPTOR TIPO TOLL 4 PELA
ANGIOTENSINA II CONTRIBUI PARA A HIPERTENSÃO ARTERIAL E
DISFUNÇÃO VASCULAR ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração de Fisiologia Cardiovascular.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. María Jesús Alonso

VITÓRIA

2014

Batista, Priscila Rossi de

Upregulation do receptor tipo Toll 4 pela angiotensina II contribui para a hipertensão arterial e disfunção vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio. / Priscila Rossi de Batista – 2014.

220f

Orientador: Dalton Valentim Vassallo

Co-orientador: María Jesus Alonso

Tese (doutorado)- Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Toll like receptor 4*. 2. Disfunção Endotelial. 3. Reatividade vascular. I. Vassallo, Dalton Valentim. II. Universidade Federal do

Dedico esta tese de doutorado, como muito carinho e gratidão, à Sueli Maria Rossi, anjo em forma de mãe que Deus me presenteou com toda Sua bondade.

Mãe, sem o seu direcionamento, apoio, cuidados e, acima de tudo, sem o seu incondicional amor materno, eu não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada por acreditar em todos os meus sonhos.

Meu especial agradecimento à minha co-orientadora, María Jesús Alonso, que não somente me presenteou com esta incrível linha de pesquisa, mas, sobretudo, me acolheu com muita consideração, respeito, confiança e carinho durante todo o tempo que passei em Madrid, aonde foram realizados muitos dos experimentos deste trabalho.

Mariajê, muchas gracias por todo lo que me has enseñado en la investigación y en la vida. Creo que soy una científica y una persona mejor después de mi estancia madrileña sob su dirección.

AGRADECIMENTOS

E assim, um conjunto de ideias, aprendizado, projetos, papers, emoções, experimentos, viagens e infindáveis horas de leitura e escrita passa a receber o nome de Tese. Depois dessa incrível caminhada, é chegado o momento de agradecer a todos aqueles que participaram dela comigo, com toda a gratidão que pode caber dentro de um coração.

Agradeço inicialmente a Deus, por iluminar e preencher de bênçãos a minha formação pessoal e profissional, na qual sempre estiveram presentes, sobretudo, os Seus ensinamentos. Sou imensamente agradecida à companhia misericordiosa do Senhor durante essa longa jornada, fazendo com que a fé e a esperança não me desamparassem nos momentos árdusos.

Com todo respeito, admiração e carinho, agradeço de modo especial ao meu orientador Dr. Dalton Valentim Vassallo. Chefe, muito obrigada por me acolher no LEMC, desde a especialização, passando pelo mestrado e doutorado, somando oito anos em que me orgulho de receber a sua brilhante orientação. Obrigada por me encorajar sempre, por me amparar diante das adversidades, conseguindo despertar em mim todo entusiasmo e alegria de um pesquisador. Obrigada por me inspirar e por me fazer enxergar a ciência como uma imensa paixão! Quero agradecê-lo, também, por ter oportunizado meu doutorado-sanduíche em Madrid, afinal, nem nos meus maiores sonhos eu imaginei que pudesse viver tudo aquilo um dia. Sou eternamente agradecida por todo o aprendizado adquirido sob a sua orientação.

À professora Dra. Ivanita Stefanon, pela maneira notória que contribui para o PPGCF e para o LEMC. É uma honra tê-la em nosso laboratório, sempre prestativa e disposta a se mobilizar em prol do bom funcionamento das coisas (e das pessoas!). Obrigada por nos acolher e nos fazer raciocinar por inúmeras horas após o seminário, diante de suas críticas enriquecedoras durante a apresentação de nossos projetos.

Ao professor Dr. Leonardo dos Santos, meu agradecimento não somente por aceitar o convite de compor a banca examinadora desta tese, mas, sobretudo, por sua significativa contribuição ao LEMC. Obrigada pelas ideias, questionamentos, e pelas tantas dúvidas esclarecidas, concretizando muitos dos conhecimentos que

pareciam abstratos para mim. Agradeço por estar conosco e disponibilizar sua sabedoria para o desenvolvimento da ciência.

A doce professora Dra. Alessandra Simão Padilha, que incentivou meus primeiros passos como pesquisadora. Alê, me considero uma pessoa de muita sorte por ter sido acolhida de modo especial por você no começo desta caminhada. Seu entendimento para as questões de reatividade vascular sempre foi muito admirado por mim, incentivando os meus estudos. De co-orientadora do mestrado, você tornou-se uma querida amiga. Alegro-me de todas suas conquistas, e desejo muito a sua felicidade!

À Dra. Paula Frizzera Vassallo, pela colaboração que nos dá no laboratório, com suas relevantes considerações clínicas a respeito do nosso mundo, muitas vezes, estritamente experimental. Agradeço de modo particular aos ensinamentos que obtive sobre migração e proliferação celular.

Muchas gracias también a Dra. Mercedes Salaices y a Dra. Ana Briones, de la Universidad Autonoma de Madrid, por me enseñaren su modo admirable de trabajar, por me aceptaren en el L4, donde he aprendido una infinidad de tecnicas, y por todo cariño y preocupación cuando lás cosas no iban muy bien. Gracias por la relevante cooperación con la ciencia del Brasil.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, que tornaram esses longos anos, certamente, mais divertidos: Camila, Carol, Dieli, Edna, Elis, Emília, Fabizinha, Gilson, Jô, Karol, Keli, Lora, Mirinha, Paula, Renatinha, Roger, Sabrina, Samya, Tatiane, Teca, Vinícius.

À minhas amigas Fabiana Vieira Simões e Thais de Oliveira Faria, por me oferecerem o acolhimento que buscamos em uma amizade. Pelo abraço apertado em meio à correria e às dificuldades da rotina. Por compreenderem a ausência dos últimos meses. Pelo carinho que sempre me ofereceram e pela sintonia com que vocês estão conectadas aos meus sentimentos.

Agradeço, com carinho, à Bruna e à Maylla, por dividirem sonhos, expectativas, frustrações, saudade (muita saudade) e, certamente, muitas alegrias, advindas da nossa convivência em Madrid. Deus parece ter escolhido com muito critério quem seriam as minhas primeiras compañeras de piso.

Ainda sobre as pessoas que Deus, especialmente, colocou no meu caminho durante esta jornada, agradeço aos meus demais compañeros do piso de la Calle Lombía, 8, 2, 8, o mais animado de Madrid: Kakau, Débora, Andi, Dani, Vinícius e Neto (não simultaneamente, claro!). Vocês fizeram parte de uma experiência cheia de aprendizados! Muito obrigada a cada um de vocês pelo companheirismo, pelas lágrimas coletivas, pelas viagens, por aliviarem momentos de dor, por intensificarem as alegrias, por tornarem um simples lunes um evento, enfim, pela intensidade de tudo que vivemos! Cada um de vocês me ensinou alguma coisa muito importante (ou várias!) que eu levarei para sempre comigo.

A mis compañeros de (mucho) trabajo en Madrid: Roberto Palacios, Angela Martín y Raquel Hernanz. Muchiiiiiiiiísimas gracias por la grand contribución en el desarrollo de esto trabajo, por la comprensión con mi español y con mi dificultad en lás tecnicas de bioquímica. Soy muy agradecida por todo, y seguro que me voy acuerdar de vosotros siempre con mucho cariño, admiración y gratitud.

A los demás compañeros de la URJC y de la UAM, por la convivencia en los desayunos, en las celebraciones, en los duros días de experimentos, en las comidas... Gracias por tantas risas! Aún lamento no comprender todas las cosas cuando hablaban más rápido y, así, disfrutar más de vosotros.

De modo especial, agradezco a Soraya y a Cris, que hicieran mi estancia lejo de Brasil mucho mejor devido vuestra amistad. No puedo olvidar de la compañía, orientación y ayuda com todos los tipos de problemas. La palabra animo queda como un bueno recuerdo de vosotras. Espero verlas pronto!

A profesora Dra. Adriana Izquierdo Lahuerta, de la URJC, por todo cariño, por tantas horas en el coche me enseñando las cosas de Madrid, y por la preocupación conmigo y con mis resultados. Mi cariño por ti vas a seguir para siempre, porque has sido muy especial para mí.

Aos demais professores e funcionários do PPGCF da UFES, da UAM e da URJC.

À Cindy, à Emilly e ao Marito, por aceitarem a empreitada de trabalhar todos os três turnos, todos os dias da semana, na finalização do meu projeto, após minha entusiasmada chegada da Espanha, com algumas ideias e bastante trabalho para

pôr em prática. Obrigada por confiarem em mim e por todo apoio que me deram em um momento muito decisivo da minha tese.

À Emily, meu agradecimento especial de prima, e meu carinho por você acreditar que a minha escolha pudesse ser uma boa ideia a ser seguida. Obrigada pelo carinho na hora do desespero e pela doçura em meio aos dias amargos. Aproveito para dizer que me sinto muito orgulhosa ao vê-la trabalhando de forma tão dedicada e comprometida.

À Luciana Passamani, ser humano admirável, de personalidade incrível, que esteve presente em todas as batalhas dessa minha caminhada, seja nos momentos de alegria, com as Lufanéias reunidas em Guarapari, seja na dureza da jornada de trabalho, ou ainda, nas conversas de olhos mareados pelo Skype durante nossa estância na Europa. Sua dedicação e disciplina são inspiradoras! Sabe por quê, Lu?

Aos amigos que não estão mais efetivamente no laboratório, mas que guardo com muito carinho no coração para toda a vida: Edu, Núbia e Lu Camilo.

Aos tantos outros alunos do LEMC e de toda a Fisiologia que contribuíram para o meu trabalho e para todos os agradáveis momentos.

Às professoras do Departamento de Morfologia da UFES, Aurélia e Juliana, pelo exemplo de dedicação, seriedade e êxito como docentes. Agradeço por me inspirarem e pela importante acolhida recentemente.

Àqueles que sempre me serviram de brilhante exemplo da tríade fisioterapeuta X professor X pesquisador, meus eternos mestres Franck e Giulia. Serei eternamente grata por terem me apresentado ao LEMC. Tenho muito orgulho de ter sido aluna de vocês durante a graduação.

Meu agradecimento ao meu pai, Hervan José de Batista, cujo sobrenome tornou-se meu nome científico, não por acaso. Obrigada por ter me ensinado a ser uma pessoa organizada, disciplinada e, mesmo sofrendo às vezes, metódica. Para a ciência, essas características podem ajudar um bocado. Muito obrigada por seu carinho, por acreditar em mim e por compreender os momentos de minha ausência. Tenha certeza que quero continuar a seguir sendo um motivo para a sua alegria.

Agradeço ao meu irmão, Hervan Rossi de Batista, cuja existência me faz sentir sempre amparada, na presença do melhor dos amigos. Obrigada por ter acreditado em mim e me ajudado, desde muito nova, com as questões de matemática e física, ensinando-me a raciocinar e não somente fazer desenhos coloridos no caderno, o que era de minha predileção. Obrigada por me ajudar na estatística, no meu fraquíssimo inglês, nas conclusões óbvias, e nos questionamentos sobre qualquer assunto. Peço desculpas por todas as vezes em que estive ausente, embora eu tenha certeza de sua compreensão.

Agradeço aos meus familiares, paternos e maternos, os quais não somente torceram e se alegraram diante das minhas conquistas, mas muitos também sempre ajudaram diretamente e me incentivaram nos estudos. Minha gratidão imensa a vocês!

Às minhas grandes amigas, obrigada por tantas vezes compreenderem minha distância. Obrigada pelas palavras de conforto, pela diversão, pelo apoio nos momentos difíceis e, acima de tudo, por saber que posso sempre contar com vocês: Mary, Camilinha, Prussia, Lud, Milena, Livia e Paulinha.

À Camilinha, ainda, meu agradecimento técnico (rs) pela prontidão e destreza na confecção dos triângulos de aço inoxidável que permitiu os estudos de reatividade vascular dos segmentos da aorta.

À lasmin Amora, cujo nome de publicação será muito lindo, e em breve, com a graça de Deus e com a sua admirável dedicação e persistência. Minha gratidão por sua doçura e carinho comigo, e por compreender as tantas vezes em que me fiz ausente, adiando momentos de convívio tão especiais.

À querida Eliana, pelo carinho, parceria, confiança, e pelas longas, corridas ou intrigantes conversas. Por me fazer conhecer mais sobre os ensinamentos de Deus, sobre a bondade, e sobre a importância dos bons sentimentos / pensamentos.

Ao Dr. Saulo Gomes de Oliveira, pela oportunidade e credibilidade de participar da produção científica do ambulatório de Joelho da Santa Casa de Misericórdia de Vitória. Agradeço por todo apoio e incentivo, e, principalmente, por acreditar na ciência.

Aos meus alunos do Curso de Fisioterapia da UFES com os quais descubro diariamente o meu imenso amor pela docência. Obrigada pela grandiosa cooperação e carinho que sempre tiveram comigo, sobretudo nas últimas semanas, decisivas para a conclusão desta tese.

Agradeço também aos professores do Curso, representados pela coordenadora - e companheira de laboratório -, Dra. Fernanda Moura Vargas Dias, pela constante inspiração que vejo em vocês, pelo reconhecido apoio que tenho recebido, pela compreensão diante da ausência nos últimos compromissos e pela contribuição de cada um de vocês para o meu crescimento. Aos funcionários do DEIS, obrigada pelo carinho e pela disponibilidade em me ajudar.

Obrigada aos meus pacientes por confiarem que eu pudesse cuidar de cada um de vocês, na medida em que me ensinavam muito do que sou capaz de transmitir em sala de aula para os alunos. Obrigada por me ensinarem sobre a importância do cuidado, e por me garantirem a certeza da minha nobre escolha profissional ao ter escolhido a Fisioterapia.

Ao amável Marco Aurélio Rachid de Araújo que, na reta final desta caminhada, Deus colocou em minha vida, para me ensinar alegre e pacientemente, como renovar o entusiasmo, a esperança e, sobretudo, os sonhos. Obrigada por todo carinho, confiança, cuidado e companheirismo imensamente valiosos no momento em que o desânimo e o cansaço pareciam inevitáveis. Obrigada por me ensinar sobre o amor! Também não poderia deixar de agradecer-lo por toda ajuda que me ofereceu nos últimos meses, através das construtivas críticas, da formatação da tese, da normatização das mais de 300 referências, cedendo nosso tão valioso e escasso tempo para me auxiliar na conclusão deste trabalho.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPES/FUNCITEC.

Education is not preparation for life.

Education is life itself.

(John Dewey)

RESUMO

A hipertensão arterial é considerada um processo inflamatório crônico, sendo a imunidade adaptativa um importante mediador deste processo. O receptor tipo Toll 4 (TLR4), que desencadeia a imunidade inata, pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares, no entanto, pouco é conhecido sobre a participação deste receptor na hipertensão arterial. Objetivamos, assim, investigar se a ativação do TLR4 devido ao incremento do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) contribui para a hipertensão e para as alterações vasculares associadas. Para isso, utilizamos os seguintes grupos de ratos: Wistar e SHR controles; SHR losartan (losartan 15 mg / kg•dia); Wistar e SHR IgG (anticorpo IgG 2_a não-específico, 1 µg / dia); SHR anti-TLR4 (anticorpo anti-TLR4, 1 µg / day). Utilizamos também células de músculo liso vascular (CMLVs) e segmentos de aorta de Wistar e SHRs controles. Os níveis de mRNA de TLR4 foram maiores tanto nos segmentos quanto nas CMLVs de aortas de SHRs comparados aos Wistar. O tratamento com losartan reduziu esses níveis em SHRs. O tratamento de SHRs com anti-TLR4: 1) reduziu a pressão arterial, a frequência cardíaca e a contração induzida por fenilefrina enquanto melhorou o prejuízo ao relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta; 2) aumentou a potenciação da contração à fenilefrina na ausência do endotélio; e 3) aboliu os efeitos inibitórios de tirón, apocinina e catalase sobre a resposta contrátil à fenilefrina, bem como aboliu os efeitos potenciadores desses fármacos sobre o relaxamento induzido por acetilcolina. Em CMLVs de SHR, angiotensina II aumentou os níveis de mRNA de TLR4 e losartan reduziu este aumento. CLI-095, inibidor de TLR4, reduziu o aumento de NOX-4, de atividade da NADPH oxidase, de produção de ânion superóxido, de expressão gênica e proteica de COX-2, e de migração e proliferação induzidos por angiotensina II. Em conclusão, a via de ativação do TLR4 pelo aumento da atividade do SRA está envolvida na hipertensão e, através da indução do estresse oxidativo, contribui para as alterações vasculares associadas a este processo patológico. Esses resultados sugerem que o TLR4 e a imunidade inata podem desempenhar um importante papel na hipertensão e em suas lesões associadas nos órgãos-alvo.

Palavras-chave: *Toll like receptor 4*, disfunção endotelial, reatividade vascular.

ABSTRACT

Hypertension is considered as a chronic inflammatory disease, with adaptive immunity being an important mediator of this process. Toll like receptor 4 (TLR4) - that triggers the innate immunity - may have a role in the development of several cardiovascular diseases; however, little is known about its participation in hypertension. We aimed to investigate whether TLR4 activation due to the increased activity of the renin-angiotensin system (RAS) contributes to hypertension and its associated vascular damage. For this, we used the following groups: Wistar and SHR controls; SHR losartan (losartan 15 mg/kg•day); Wistar and SHR IgG (non-specific IgG 2_a, 1 µg/day); SHR anti-TLR4 (antibody anti-TLR4, 1 µg/day). We also used aortic segments and vascular smooth muscle cells (VSMCs) from Wistar and SHRs controls. TLR4 mRNA levels were greater in aortic segments and VSMCs from SHRs compared with Wistar rats; losartan treatment reduced those levels in SHRs. Treatment of the SHRs with the anti-TLR4 antibody: 1) reduced the increased blood pressure, heart rate and phenylephrine-induced contraction while it improved the impaired acetylcholine-induced relaxation in aortic rings; 2) increased the potentiation of phenylephrine contraction after endothelium removal; and 3) abolished the inhibitory effects of tiron, apocynin and catalase on phenylephrine-induced response as well as its enhancing effect of acetylcholine-induced relaxation. In SHR VSMCs, angiotensin II increased TLR4 mRNA levels, and losartan reduced that increase. CLI-095, a TLR4 inhibitor, mitigated the increases in NOX-4, NADPH oxidase activity, superoxide anion production, COX-2 gene and protein expression, migration and proliferation that were induced by angiotensin II. In conclusion, TLR4 pathway activation due to increased RAS activity is involved in hypertension and by inducing oxidative stress contributes to the endothelial dysfunction associated to this pathologic process. These results suggest that TLR4 and innate immunity may play a role in hypertension and its associated end-organ damage.

Key-words: Toll like receptor 4, endothelium dysfunction, vascular reactivity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema representativo de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular intacto e suas repercussões na circulação sistêmica e no músculo liso vascular.....36
- Figura 2 – Expressão celular e intracelular das isoformas da NADPH oxidase na parede do vaso sanguíneo.....42
- Figura 3 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização ativadas por TLR4, a via dependente de MyD88 e a via independente de MyD88, que representam a ativação precoce e tardia de NF- κ B, respectivamente.52
- Figura 4 – Esquema representativo dos grupos de animais utilizados no presente estudo, bem como dos respectivos protocolos experimentais desenvolvidos, na sequência em que foram analisados:61
- Figura 5 – Registros de parâmetros hemodinâmicos de um rato SHR IgG (usado como controle do tratamento com anti-TLR4) demonstrando:65
- Figura 6 – Aorta torácica, de um rato Wistar, imersa em solução fria de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo, sendo dividida em segmentos cilíndricos de 3 a 4 mm. (Adaptado de Angeli, 2013).....67
- Figura 7 – Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro* (adaptado de Faria, 2014).....68
- Figura 8 – Registro com curvas representativas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. Teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:70
- Figura 9 – Esquema representativo das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe), em que pode ser observada a vasoconstrição do anel de aorta (A); e à acetilcolina (ACh), na qual é possível observar a vasodilatação dependente do endotélio (B).....71
- Figura 10 – Esquema do protocolo para avaliação da liberação basal de óxido nítrico em anéis de aorta de ratos, demonstrando o cálculo para obter a porcentagem de contração do L-NAME em relação à contração prévia com fenilefrina (Fe).73
- Figura 11 – Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe) (A) e à acetilcolina (ACh) (B), após a incubação por 30 minutos com tiron (1 μ M), apocinina (30 μ M), ou catalase (1000 U/mL).74

Figura 12 – Fotografia de células de músculo liso vascular em que se podem observar as fibras de α -actina, em verde. Imagem obtida com microscópio confocal Leica TCS SP2, com lente objetiva de 63X (zoom 2X).	80
Figura 13 – Esquema representativo do protocolo experimental utilizado ao final da cultura de células de músculo liso de aorta de ratos SHR controle.....	81
Figura 14 – Esquema representando a cultura de células de músculo liso de aorta sobre dois pequenos cristais, para posterior mensuração da produção de ânion superóxido pela técnica de dihidroetídeo (DHE).	89
Figura 15 – Esquema do protocolo de migração celular (método <i>Wound Healing</i>):..	94
Figura 16 – Esquema representativo da visualização da contagem das células pela câmara de Neubauer.....	96
Figura 17 – Expressão de RNAm de TLR4 vascular é maior em ratos hipertensos que normotensos.....	104
Figura 18 – Receptor TLR4 está localizado nas três camadas da aorta, estando mais presente em ratos SHR do que em Wistar. Fotomicrografias confocais fluorescentes representativas da imunolocalização do receptor TLR4 nos segmentos de aorta de ratos Wistar e SHR controles, através da utilização do corante Alexa Fluor 546 (tamanho da imagem: 238 X 238 μ m).	104
Figura 19 – Tratamento com losartan não influencia no ganho de peso corporal de ratos SHR.....	105
Figura 20 – Losartan reduz pressão arterial sistólica de ratos hipertensos.....	106
Figura 21 – Angiotensina II, através do receptor AT ₁ , contribui para o aumento dos níveis de RNAm de TLR4 observado em aortas de SHRs.....	107
Figura 22 – SHR apresenta menor peso corporal que ratos Wistar.	109
Figura 23 – Inibição do TLR4 reduz pressão arterial e frequência cardíaca de ratos hipertensos.....	110
Figura 24 – Tratamento com anti-TLR4 não afeta o peso do coração, o comprimento da tibia e a razão entre esses parâmetros.	112
Figura 25 – Hipertensão arterial prejudica a integridade endotelial de anéis de aorta.	114
Figura 26 – Ratos SHR apresentam aumento da vasoconstrição induzida por fenilefrina e prejuízo do relaxamento induzido por acetilcolina.	115
Figura 27 – Inibição de TLR4 reduz o incremento da vasoconstrição causada por fenilefrina e melhora a vasodilatação em aortas de ratos hipertensos.....	116

Figura 28 – Ratos hipertensos apresentam prejuízo da participação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina.	118
Figura 29 – Tratamento com anti-TLR4 reestabelece a participação do endotélio na resposta vascular induzida por fenilefrina.	119
Figura 30 – O tratamento com anti-TLR4 reverte a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico presente em aortas de ratos hipertensos.	121
Figura 31 – Produção de EROs contribui para o aumento da resposta vasoconstritora em SHRs.	123
Figura 32 – Inibição de TLR4 reduz o envolvimento do estresse oxidativo sobre o aumento da reatividade vascular à fenilefrina em SHRs	125
Figura 33 – Prejuízo de vasodilatação em SHRs é influenciado pelo estresse oxidativo vascular.	127
Figura 34 – Tratamento de SHRs com anti-TLR4 reverte o prejuízo do relaxamento causado pelo estresse oxidativo vascular.	129
Figura 35 – Angiotensina II promove incremento dos níveis de RNAm do TLR4 em CML Vs de SHRs.	132
Figura 36 – O incremento de TLR4 causado por angiotensina II em CML Vs de SHRs ocorre através do receptor AT ₁	132
Figura 37 – Inibição de TLR4 reduz o aumento da expressão gênica de NOX-4 provocado por angiotensina II.	134
Figura 38 – Inibição do receptor TLR4 reduz a atividade da NADP(H) oxidase estimulada por angiotensina II.	135
Figura 39 – CLI-095, inibidor de TLR4 reduz a produção de ânions superóxidos aumentada por ação da angiotensina II.	136
Figura 40 – Expressão gênica e proteica de COX-2 aumentada em SHRs por angiotensina II é reduzida por inibição de TLR4.	138
Figura 41 – Migração celular aumentada por angiotensina II é reduzida pela inibição de TLR4.	140
Figura 42 – Aumento da proliferação celular estimulada por angiotensina II é reduzido por CLI-095.	141

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores de pressão arterial sistólica (PAS), em mmHg, obtidos por pletismografia da artéria caudal de ratos SHR controle e SHR tratados com losartan (15 mg / Kg . dia, na água de beber)..... 106
- Tabela 2 – Valores de peso corporal, em gramas, de ratos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 tratados por 14 dias com os respectivos anticorpos (1 µg / dia diluído em salina, via intraperitoneal)..... 108
- Tabela 3 – Medidas hemodinâmicas de ratos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 após 14 dias de tratamento com anticorpo. PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; PAM: Pressão Arterial Média; FC: Frequência Cardíaca. 111
- Tabela 4 – Valores obtidos do peso do coração (g), comprimento da tibia (cm) e da razão peso do coração/comprimento (g/cm) da tibia nos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 tratados com anticorpo por 14 dias. 112
- Tabela 5 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe, 0,1 nM – 0,3 mM) e à acetilcolina (ACh, 0,01 nM – 0,3 mM) em anéis de aorta de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4, tratados por 14 dias com anticorpo. 117
- Tabela 6 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos nas curvas concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) na presença (E+) e ausência de endotélio (E-) em ratos dos grupos Wistar e SHR IgG e SHR anti-TLR4 tratados por 14 dias com anticorpo. 120
- Tabela 7 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas de fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4, na ausência (controle, ct) ou na presença dos antioxidantes tiron (tir), apocinina (apo) e catalase (cat)..... 124
- Tabela 8 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos nas curvas de acetilcolina (0,01 nM – 0,3 mM) após contração com uma única dose de fenilefrina (Fe, 1µM) de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4, na ausência (controle, ct) ou na presença dos antioxidantes tiron (tir), apocinina (apo) e catalase (cat). 130

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina difosfato

ANOVA: análise de variância

AP-1 (activator protein 1): proteína ativadora 1

BGP: β -glicerolfosfato

BSA (*bovine serum albumin*): albumina de soro bovino

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: cloreto de cálcio dihidratado

CEI *Comité de Ética de la Investigación*

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais

CMLV: célula muscular lisa vascular

CO_2 : dióxido de carbono

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2: ciclooxigenase-2

dAUC: diferença da área abaixo da curva

DAG: diacilglicerol

DAMP (*damage-associated molecular pattern*): padrão molecular associado ao dano

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DC: débito cardíaco

DEPC: dietilpirocarbonato

DHE: dihidroetídio

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxiribonucleico

DNAC: DNA complementar

DOCA-sal: desoxicorticoesterona-salina

EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*): fator relaxante derivado do endotélio

EDHF: (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*): fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético

EGTA: ácido etilenoglicol tetraacético

EPM: erro padrão da média

ERK 1/2 (*extracellular regulated kinases 1/2*): quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular

ERO: espécie reativa de oxigênio

FBS (*fetal bovine serum*): soro fetal bovino

FC: frequência cardíaca

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GCs: guanilato cíclico

GMPc: 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

GPx: glutatona peroxidase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HOCl: ácido hipocloroso

HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*): proteína do grupo alta mobilidade Box 1

HSP (*heat shock protein*): proteína de choque térmico

ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule-1*): molécula de adesão intercelular-1

IFN: interferón

IgG: imunoglobulina G

IgG 2a: imunoglobulina G secundária

IKK (*IκB kinase*): quinase IκB

IL: interleucina

IP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol

IP-10 (IFN- γ -inducible protein 10): proteína 10 induzível por interferón γ

IRAK (interleukin receptor-associated kinase): quinase associada ao receptor da interleucina

JNK (*JUN N-terminal kinase*): quinase JUN N-terminal

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato monopotássico

L-NAME: dicloridrato de N^G-nitro-L-arginina metil éster

LPB (*LPS-binding protein*): proteína de ligação ao lipopolissacarídeo

LPS: lipopolissacarídeo

LRR (*leucine rich repeat*): repetições ricas em leucina

MAPk (*mitogen-activated protein kinase*): proteína quinase ativada por mitógeno

MD2 (*myeloid differentiation receptor 2*): receptor de diferenciação mielóide 2

MLC: cadeia leve da miosina

MLCK: quinase da cadeia leve da miosina

MgSO₄.7H₂O: sulfato de magnésio heptahidratado

MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*): fator de diferenciação mielóide 88

n: número de animais ou unidades experimentais

Na₂ EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético, sal dissódico

Na₃VO₄: ortovanadato de sódio

NaCl: cloreto de sódio

NADPH oxidase: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase

NaF: fluoreto de sódio

NaHCO₃ (bicarbonato de sódio)

NF (*nuclear factor*): fator nuclear

NOS: oxido nítrico sintase

OCT (*Optimum cutting temperature*): meio de congelamento de tecidos

ONOO⁻: peróxido de nitrito

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*): padrão molecular associado a patógeno

PAS: pressão arterial sistólica

PBS (*phosphate buffered saline*): solução tampão fosfato-salino

PDGF (*platelet-derived growth factor*): fator de crescimento derivado de plaquetas

PES: etosulfato de fenazina

PFA: paraformolaldeído

PGI₂: prostaciclina

PGH₂: prostaglandina H₂

PGF₂α: prostaglandina F₂α

PKC: proteína quinase C

PKG: proteína quinase G

PLC: fosfolipase C

PPGCF: Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

P-S: Penicilina – Estreptomicina

qRT-PCR: *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* em tempo real

RIPA: *Radioimmunoprecipitation Assay*

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RT-PCR: *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*

RVP: resistência vascular periférica

SERCA: Ca²⁺ ATPase do retículo sarcoplasmático

SDS: dodecil sulfato sódico

SHR (*spontaneously hypertensive rats*): ratos espontaneamente hipertensos

SI: Sistema Internacional

SOD: enzima superóxido desmutase (SOD)

SRA: sistema renina angiotensina

TAB (*TAK binding protein*): proteína de ligação ao TAK

TAK (*TGF-β-activated kinase*): quinase ativada por TGF-β

Temed: tetrametiletilenodiamina

TGF (*tumoral growth factor*): fator de crescimento tumoral

TIR (*Toll-Interleukin-1 receptor*): receptor Toll-Interleucina-1

TIRAP (*TIR associated protein*): proteína associada ao domínio TIR

Tiron: 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno-dissulfonico

TLR (*Toll like receptor*): receptor tipo Toll

TNF (*tumoral nuclear factor*): fator de necrose tumoral

TRAF (*tumoral nuclear factor associated factor*): fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral

TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*): domínio TIR que contém adaptador que induz o interferón

TRAM (*Toll-like receptor adaptor protein*): preteína adaptadora do TLR

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

Tween 20: polioxietileno sorbitano 20

TXA₂: tromboxano A₂

UAM: *Universidad Autónoma de Madrid*

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

URL: Unidades Relativas de Luz

URJC: Universidad Rey Juan Carlos

VEGF (*vascular endothelial growth factor*): fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL	32
1.1.1	Disfunção endotelial na hipertensão arterial	34
1.2	FATORES REGULADORES DO TÔNUS VASCULAR	37
1.2.1	Óxido Nítrico	38
1.2.2	Espécies Reativas de Oxigênio	40
1.2.3	Ciclooxigenase-2	43
1.2.4	Sistema Renina-Angiotensina	44
1.3	RESPOSTA IMUNE E HIPERTENSÃO ARTERIAL	47
1.4	RECEPTORES TIPO TOLL	49
1.4.1	Receptores tipo Toll 4 (TLR4) e resposta inflamatória	49
1.4.2	Receptores tipo Toll 4 (TLR4) e doenças cardiovasculares	53
2	OBJETIVOS	55
2.1	OBJETIVO GERAL	56
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3	MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	58
3.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	59
3.3	MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	62
3.4	MEDIDA DIRETA DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS	64
3.5	REATIVIDADE VASCULAR	66
3.5.1	Avaliação da integridade do músculo liso vascular	69
3.5.2	Avaliação da integridade funcional do endotélio	69
3.5.3	Avaliação do tratamento com anti-TLR4 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina	70
3.5.4	Avaliação da inibição do TLR4 sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio	71

3.5.5	Estudo da modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	72
3.5.6	Avaliação da liberação basal de óxido nítrico.....	72
3.5.7	Análise da participação das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina	73
3.5.8	Análise da participação das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina	74
3.6	IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	75
3.7	CULTURA DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE AORTA.....	77
3.7.1	Obtenção das células de músculo liso vascular.....	77
3.7.2	Crescimento das culturas primárias de células de músculo liso ..	78
3.7.3	Caracterização das células de músculo liso vascular	79
3.7.4	Protocolos experimentais em células de músculo liso vascular ..	80
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO	83
3.9	ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE	86
3.10	PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO	88
3.11	EXPRESSÃO PROTEICA DA CICLOOXIGENASE-2.....	90
3.12	MIGRAÇÃO CELULAR	93
3.13	PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	95
3.14	EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	97
3.15	FÁRMACOS, REAGENTES e ANTICORPOS	98
4	RESULTADOS	102
4.1	RESULTADOS INICIAIS: EXPRESSÃO VASCULAR DE TLR4	103
4.1.1	Expressão vascular de RNAm de TLR4 é maior em ratos hipertensos	103
4.1.2	Angiotensina II contribui para o aumento da expressão gênica de TLR4 em ratos SHR	105
4.2	RESULTADOS OBTIDOS EM RATOS TRATADOS COM ANTI-TLR4	108

4.2.1	Inibição de TLR4 reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos hipertensos.....	108
4.2.2	Tratamento com 1 µM / dia de anti-TLR4 por 14 dias não influencia o peso do coração e o crescimento ósseo de ratos hipertensos	111
4.2.3	Hipertensão arterial prejudica a integridade endotelial de anéis de aorta de ratos	113
4.2.4	SHRs apresentam aumento da vasoconstrição induzida por fenilefrina e prejuízo do relaxamento induzido por acetilcolina.....	114
4.2.4.1	Tratamento com anticorpo anti-TLR4 reduz o incremento da vasoconstrição induzida por fenilefrina e melhora a vasodilatação à acetilcolina em SHRs.....	115
4.2.5	Ratos hipertensos apresentam prejuízo da participação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	117
4.2.5.1	Tratamento com anticorpo anti-TLR4 reestabelece a participação do endotélio na resposta vascular induzida por fenilefrina	118
4.2.6	A hipertensão reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico e o tratamento com anti-TLR4 reverte esta alteração.....	120
4.2.7	Produção de espécies reativas de oxigênio contribui para o aumento da resposta vasoconstritora em ratos hipertensos	122
4.2.7.1	Inibição de TLR4 reduz a participação de EROs sobre o aumento da contratilidade vascular de SHRs	124
4.2.8	Prejuízo de vasodilatação em SHRs é influenciado pelo aumento da produção EROs.....	126
4.2.8.1	Tratamento de ratos hipertensos com anti-TLR4 reverte o prejuízo do relaxamento causado pelo estresse oxidativo vascular. 128	
4.3	RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE CULTURA DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.....	131
4.3.1	Angiotensina II promove incremento da expressão do TLR4 em CMLVs de SHRs através do receptor AT ₁	131

4.3.2	O aumento da expressão gênica de NOX-4 provocado por angiotensina II é reduzido através da inibição de TLR4.....	133
4.3.3	A inibição do receptor TLR4 reduz a atividade da NADP(H) oxidase e a produção de ânions superóxidos induzidos por angiotensina II	135
4.3.4	Aumento da expressão gênica e proteica de COX-2 provocado por angiotensina II é reduzido pela inibição do TLR4.....	137
4.3.5	CLI-095, inibidor de TLR4, reduz o aumento da migração e da proliferação celular induzidos por angiotensina II.	139
4.4	SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS.....	142
5	DISCUSSÃO	143
5.1	TLR4 PARTICIPA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL	145
5.2	ANGIOTENSINA II INFLUENCIA O AUMENTO DA EXPRESSÃO DO TLR4 EM RATOS HIPERTENSOS.....	151
5.3	TLR4 CONTRIBUI PARA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL PRESENTE NA HIPERTENSÃO	154
5.4	TRATAMENTO COM ANTI-TLR4 REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR EM RATOS HIPERTENSOS	158
5.5	ANGIOTENSINA II AUMENTA O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE SHR _s ATRAVÉS DO TLR4.....	161
5.6	TLR4 PARTICIPA DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE COX-2 INDUZIDO POR ANGIOTENSINA II EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE SHR _s	164
5.7	TLR4 CONTRIBUI PARA AUMENTO DA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR PROVOCADO POR ANGIOTENSINA II.....	166
6	CONCLUSÃO.....	168
7	REFERÊNCIAS	170
8	ANEXO I.....	203
9	ANEXO II.....	217

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial tem sido geralmente associada a alterações vasculares estruturais e funcionais, sendo importantes características deste processo patológico a disfunção endotelial e o aumento da resposta vasoconstritora. A redução da biodisponibilidade do óxido nítrico causada pelo aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), a indução de enzimas pró-inflamatórias e a exacerbação do Sistema Renina Angiotensina (SRA), entre outros, podem explicar as alterações vasculares observadas na doença hipertensiva. Neste contexto, nos últimos anos, tem sido proposto que a resposta inflamatória desencadeada pela ativação do sistema imune representa um relevante papel no desenvolvimento e progressão da hipertensão (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007; SCHIFFRIN, 2013; 2014; MCCARTHY *et al.*, 2014).

Na hipertensão arterial tem sido observado um aumento dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007), da produção de EROs (ALVAREZ *et al.*, 2007; TOUYZ & BRIONES, 2011), das respostas vasculares a lipopolissacarídeo (LPS) (BRIONES *et al.*, 1999; BRIONES *et al.*, 2000; HERNANZ *et al.*, 2004) e da expressão de genes importantes para a resposta inflamatória, como a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (ALVAREZ *et al.*, 2005; FÉLÉTOU, HUANG & VANHOUTTE, 2011). Vale ressaltar que a inflamação induz a disfunção endotelial em humanos e animais (BHAGAT & VALLANCE, 1997; HERNANZ *et al.*, 2004).

Além disso, o aumento da ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) pode estar associado com o estado inflamatório observado na hipertensão e nas alterações vasculares associadas (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007; ALVAREZ *et al.*, 2007; GARCIA-REDONDO *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013). Por sua vez, a angiotensina II, o principal peptídeo efetor do SRA, é capaz de estimular o receptor tipo Toll 4 (*Toll like receptor 4*, TLR4), e parece que a via de sinalização dependente de TLR4 contribui para os efeitos pró-inflamatórios deste fator humoral (WOLF *et al.*, 2006; OTSUI *et al.*, 2007; JI *et al.*, 2009A; JI *et al.*, 2009B; LV *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009; YUEN *et al.*, 2012).

O receptor TLR4 participa da imunidade inata e pode ser ativado por ligantes exógenos, como o LPS, e por ligantes endógenos, agindo sobre fatores de transcrição nuclear pró-inflamatórios e, assim, contribuindo para a inflamação vascular (BOMFIM *et al.*, 2011).

Tem sido relatada a participação das vias de sinalização de TLR4 nos processos subjacentes às doenças vasculares inflamatórias como aterosclerose (OTSUI *et al.*, 2007; DEN DEKKER *et al.*, 2010), diabetes, síndrome metabólica (DEVARAJ *et al.*, 2008; DASU *et al.*, 2010; XIE *et al.*, 2014; JIALAL, KAUR & DEVARAJ, 2014) e pré-eclâmpsia (KIM *et al.*, 2005; PINEDA *et al.*, 2011).

Enquanto diversos estudos têm sido direcionados à contribuição da imunidade adaptativa para a hipertensão arterial (LOHR *et al.*, 2006; GUZIK *et al.*, 2007; CROWLEY *et al.*, 2010; MADHUR *et al.*, 2010; BARHOUMI *et al.*, 2011; THABET *et al.*, 2011), existem poucas evidências relacionadas ao papel do sistema imune inato neste processo patológico (EISSLER *et al.*, 2011; BOMFIM *et al.*, 2012; SOLLINGER *et al.*, 2014). Sendo assim, os mecanismos pelos quais a imunidade inata contribui para a fisiopatologia da hipertensão arterial não são bem esclarecidos.

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial é considerada um processo patológico crônico de etiologia multifatorial, caracterizada por elevação crônica da pressão arterial basal, representando um importante fator de risco para doenças cardiovasculares. A hipertensão constitui-se um relevante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, por ser uma doença de alto risco e difícil controle, sendo responsável por alta frequência de internações hospitalares, além de gerar custos médicos e sócio-econômicos elevados, decorrentes principalmente de suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica.

Aproximadamente 25 % da população mundial adulta, cerca de um bilhão de pessoas, tem hipertensão arterial e estima-se que até 2025 a prevalência pode aumentar 29 %. Em algumas cidades brasileiras, atualmente, a hipertensão já acomete 30 % dos adultos (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010).

De acordo com as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, a *American Heart Association* e o *VIII Joint National Comitee*, os níveis pressóricos considerados normais para adultos são inferiores ou iguais a 140 mmHg de pressão arterial sistólica e a 90 mmHg de pressão arterial diastólica. Contudo, uma vez que não existe um valor preciso a partir do qual os valores de pressão arterial passam a aumentar o risco cardiovascular, a conceituação de hipertensão arterial é arbitrária e definida operacionalmente por razões práticas para avaliação de risco e tratamento de um indivíduo; e também por considerações em relação à lesão de órgãos-alvo e demais doenças associadas (PEREIRA & KRIEGER, 2005; JAMES *et al.*, 2014).

Estudos relatam que 95 % dos pacientes hipertensos são portadores de hipertensão “primária ou essencial”, que não apresenta causa evidenciada. Este tipo de hipertensão parece ser basicamente decorrente da interação de fatores genéticos e ambientais complexos e heterogêneos. Entretanto, já são conhecidos diversos fatores que contribuem para a origem e manutenção da hipertensão arterial (LAWES, VANDER HOORN & RODGERS, 2001), podendo ser classificados em intrínsecos ou extrínsecos, os quais atuam isoladamente ou associados. Dentre os fatores intrínsecos, estão incluídas as alterações nos parâmetros hemodinâmicos com modificações no débito cardíaco (DC) e na resistência vascular periférica (RVP)

(FOLKOW, 1982); alterações funcionais como, por exemplo, aumento da atividade simpática (JOYNER, CHARKOUDIAN & WALLIN, 2010) e do SRA (TOUYZ, 2005); resistência à insulina; hereditariedade (HARRAP, 1994); raça (FREIS *et al.*, 1973) e prevalência de certos grupos sanguíneos (MILLER *et al.*, 1979). Os fatores extrínsecos, por sua vez, englobam a obesidade, o tabagismo, o sedentarismo, o consumo de sal (BAKRIS & MENSAH, 2002) e o aumento de colesterol no sangue (ZHANG *et al.*, 2003), entre outros.

Sabe-se que a pressão arterial é uma entidade física, sendo assim, influenciada por fatores físicos, como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação, que são resultantes da interação entre o DC (frequência cardíaca x volume sistólico), a RVP e a capacitância venosa. Ao considerar a relação *Pressão Arterial = DC x RVP*, conclui-se que fatores capazes de alterar o DC e / ou a RVP, modificam conseqüentemente a pressão arterial. Entretanto, são alterações na resistência vascular as principais responsáveis por modificações na pressão arterial (FOLKOW, 1982; LUND-JOHANSEN, 1983; BOHR & WEBB, 1984).

A resistência vascular pode ser modificada pela estrutura, pela mecânica e pela função dos vasos sanguíneos (INTEGAN & SCHIFFRIN, 2000). Alterações estruturais, como redução do diâmetro luminal e espessamento da parede arterial, alterações mecânicas, como redução da elasticidade, bem como, modificações nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora, dependentes do endotélio (LÜSCHER & VANHOUTTE, 1986), podem repercutir em aumento da resistência vascular e, conseqüentemente, na hipertensão arterial (INTEGAN & SCHIFFRIN, 2000; MULVANY, 2002; 2003). Dentre as alterações celulares que modificam a resistência vascular, podem ser citados: o aumento intracelular de Ca^{2+} que, por sua vez, aumenta a reatividade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstritores, como os agonistas α -1 adrenérgicos, noradrenalina e fenilefrina (HOROWITZ *et al.*, 1996); o aumento da sensibilidade às proteínas contráteis; o aumento da permeabilidade da membrana aos íons cálcio e sódio, entre outros (FOLKOW, 1982; BOHR & WEBB, 1984; MARÍN, 1993).

Vasos sanguíneos de ratos hipertensos apresentam maior reatividade aos agentes pressores do que de animais normotensos (BOHR, 1974; BOHR & WEBB, 1984). Este aumento de reatividade pode estar associado à maior sensibilidade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstritores, sendo que em estados crônicos

de hipertensão arterial as modificações estruturais intensificam o aumento da reatividade (BERECEK, RASCHER & GROSS, 1979). Adicionalmente, a disfunção do endotélio vascular observada na hipertensão arterial, e em doenças como aterosclerose e hiperlipidemia, pode contribuir para o aumento da reatividade a agentes vasoconstritores, bem como para a redução da resposta a agentes vasodilatadores (SHIFFRIN, 2001).

O aumento da resistência vascular periférica associado com disfunção endotelial observado na hipertensão arterial, bem como a perda da função modulatória exercida pelos fatores derivados do endotélio parece ter participação crítica no desenvolvimento desta condição (BOHLEN, 1986). As alterações da função endotelial na hipertensão têm sido atribuídas ao desequilíbrio na geração e / ou liberação de mediadores envolvidos na contração e no relaxamento vascular (CARVALHO *et al.*, 1987; SHIFFRIN, 2001).

1.1.1 Disfunção endotelial na hipertensão arterial

O endotélio pode ser considerado como um órgão endócrino, capaz de promover síntese e liberação de substâncias metabolicamente ativas, participantes da regulação do tônus vascular. Também atua na manutenção da homeostase, na via de substâncias coagulantes e anticoagulantes, na participação de respostas inflamatórias e imunológicas; agregação plaquetária e regulação do crescimento vascular (RUBANYI, 1993).

O endotélio vascular é constituído por uma única camada de células confluentes que cobre a superfície interna dos vasos sanguíneos, com importante participação na regulação do tônus do MLV, ação fundamental para a manutenção da pressão sanguínea em níveis normais. Considerado o maior órgão endócrino no organismo, o endotélio vascular é capaz de liberar substâncias vasodilatadoras como a prostaciclina (PGI₂) (MONCADA *et al.*, 1977; VANHOUTTE, 1993), o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) conhecido como óxido nítrico (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; PALMER *et al.*, 1987) e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (TAYLOR & WESTON, 1988; FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 1988), além de substâncias vasoconstritoras como a angiotensina II (KIFOR & DZAU, 1987), a endotelina-1 (YANAGISAWA *et al.*, 1988),

e os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A_2 (TxA_2), as prostaglandinas H_2 e $F_{2\alpha}$ (PGH_2 e $PGF_{2\alpha}$) (FROLICH & FORSTERMANN, 1989; VANHOUTTE, 1993) e o ânion superóxido (FURCHGOTT, 1983; RUBANYI & VANHOUTTE, 1986) (Figura 1).

Diversas dessas substâncias regulam o estado contrátil, o crescimento e / ou apoptose das células musculares lisas, além de participarem dos processos de agregação plaquetária e de adesão de leucócitos (Moncada *et al.*, 1977; Moncada *et al.*, 1991; Kubes *et al.*, 1991; Rubanyi, 1993).

O endotélio, então, atua de modo relevante no controle do tônus vascular e da RVP, a partir da liberação de substâncias vasoativas (RUBANYI, 1993). Alterações na síntese e / ou liberação desses fatores podem interferir na gênese e / ou manutenção da hipertensão arterial (LÜSCHER & VANHOUTTE, 1986). Modificações na função endotelial como, por exemplo: aumento da síntese de fatores vasoconstritores e de fatores de crescimento; e redução da síntese ou liberação de fatores vasodilatadores podem promover elevação da resistência vascular e, conseqüentemente, da pressão arterial. Essas variações da função do endotélio foram estudadas por diversos pesquisadores, levando à denominação *disfunção endotelial* (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; PANZA, *et al.*, 1990; TADDEI *et al.*, 1993; RIZZONI *et al.*, 1996; ROSSI *et al.*, 1997).

Há relatos de que a disfunção endotelial está relacionada não apenas com a hipertensão arterial, mas também com a aterosclerose, angina, falência renal e cardíaca, síndrome coronariana, microalbuminúria, trombose, coagulação intravascular, diabetes tipo I e II, prejuízo na tolerância à glicose, resistência à insulina, hiperglicemia, obesidade, tabagismo, entre outros (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006).

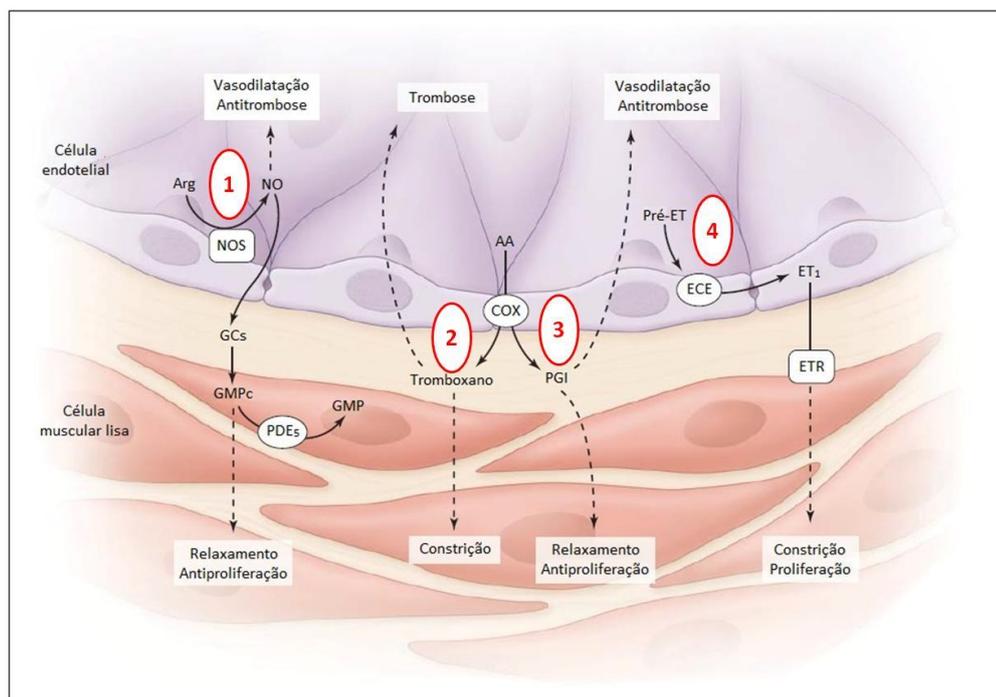


Figura 1 – Esquema representativo de substâncias vasoativas produzidas pelo endotélio vascular intacto e suas repercussões na circulação sistêmica e no músculo liso vascular.

(1) Via do óxido nítrico (NO) - vasodilatadora, (2) e (3) Via inflamatória - vasodilatadora e vasoconstritora, (3) Via da endotelina - vasoconstritora. AA = ácido araquidônico; Arg = arginina; cGMP = 3', 5' monofosfato de guanosina cíclico; COX = ciclo-oxigenase; ECE = enzima conversora de endotelina; ET1= endotelina 1; ETR = receptor de endotelina; GCs = guanilato ciclase solúvel; GMP = monofosfato de guanosina; NOS = óxido nítrico sintetase; PDE5 = fosfodiesterase de tipo 5; pre-ET = pré-endotelina (adaptado de Angeli, 2013).

1.2 FATORES REGULADORES DO TÔNUS VASCULAR

Juntamente às ações dos fatores liberados pelo endotélio, as CMLVs também exercem um papel relevante no controle da resistência vascular periférica, sendo o seu estado contrátil determinante para o diâmetro do lúmen arterial, o que irá afetar o fluxo e a pressão sanguínea (MULVANY & HALPERN, 1977).

A regulação da contração das CMLVs é dependente de uma complexa interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores através dos fatores derivados do endotélio, de neurotransmissores, de hormônios, e a própria pressão sanguínea (JACKSON, 2000; BLAUSTEIN & HAMLYN, 2010).

A contração das CMLVs depende de um aumento na concentração de cálcio (Ca^{2+}) citosólico para ser deflagrada. Essa concentração de Ca^{2+} é regulada por sistemas de entrada, saída e estoque de cálcio. O influxo de Ca^{2+} ocorre por vários canais, entre eles: canais para cálcio operados por receptores (ROCs); canais para cálcio operados por voltagem (VOCs); canais para cálcio operados por estoques (SOCs) e canais para cálcio ativados por estiramento (SACs). Outros mecanismos responsáveis pela entrada ou saída de Ca^{2+} da célula ocorrem através do trocador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, e também pelo armazenamento de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático através do sequestro de Ca^{2+} intracelular pela bomba de cálcio do retículo (KIM *et al.*, 2008, BLAUSTEIN & HAMLYN, 2010).

Desse modo, o influxo de Ca^{2+} através de canais da membrana plasmática e a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares são a maior fonte para ativação da contração. Essa contração do músculo liso vascular é mediada por dois mecanismos, sendo eles o acoplamento eletromecânico e o acoplamento farmacomecânico (SOMLYO & SOMLYO, 1968).

O acoplamento eletromecânico promove a contração através de modificações no potencial de membrana da célula. A despolarização da membrana induzida, por exemplo, pelo aumento da concentração de K^+ extracelular, promove influxo de Ca^{2+} através da abertura de canais VOCs, causando contração (BULBRING & TOMITA, 1987; GANITKEVICH & ISENBERG, 1991). Ainda, trabalhos mostram que o KCl, atua como um estímulo sensibilizador de cálcio na contração do músculo liso (RATZ *et al.*, 2005).

Por outro lado, o acoplamento farmacomecânico baseia-se na contração induzida por agonistas contráteis, como fenilefrina, norepinefrina, endotelina, angiotensina II e serotonina. Esses agonistas ligam-se a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína G. A interação agonista-receptor ativa a subunidade α da proteína G, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) levando à síntese de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 interage com seus receptores na membrana do retículo sarcoplasmático e estimula a liberação de Ca^{2+} . O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que aumenta a mobilização de Ca^{2+} através de canais da membrana, além de aumentar a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} e fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC).

Todos esses mecanismos aumentam a concentração intracelular de Ca^{2+} (Laporte *et al.*, 2004; Blaustein & Hamlyn, 2010). Dessa forma, o Ca^{2+} liga-se à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Uma vez formado o complexo Ca^{2+} -calmodulina, ocorre ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), viabilizando a interação entre os miofilamentos de actina e miosina, portanto, a contração muscular (STULL, *et al.*, 1991; HOROWITZ, *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2008). Quando a concentração intracelular de Ca^{2+} é menor que 1 μM , ocorre desativação do complexo cálcio-calmodulina-MLCK. Entra em ação, então, a enzima fosfatase de cadeia leve, removendo o grupo fosfato da miosina, ou seja, desfosforilando-a. Assim, a baixa atividade da ATPase inibe a contração e, conseqüentemente, induz ao relaxamento do músculo liso vascular.

Desse modo, fatores derivados do endotélio vascular, hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos possuem capacidade regulatória sobre a atividade contrátil das células do músculo liso vascular e, portanto, sobre o tônus vascular, fator determinante da resistência vascular periférica, e, conseqüentemente, da pressão arterial.

1.2.1 Óxido Nítrico

Em 1980, Furchgott & Zawadzki relataram a descoberta do Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF), ao demonstrarem a capacidade das células endoteliais de liberar um potente vasodilatador (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980;

FURCHGOTT, 1984; MONCADA *et al.*, 1991). Após especulações sobre qual molécula / substância seria, de fato, este fator vasodilatador, foi descrito que o EDRF é o radical livre biatômico óxido nítrico (PALMER *et al.*, 1987; FURCHGOTT, 1988; ANGUS & COCKS, 1989; MARÍN & SÁNCHEZ-FERRER, 1990; MONCADA *et al.*, 1999; MARIN & RODRIGUEZ- MARTINEZ, 1995).

Através da ação da sintase do óxido nítrico (NOS), a L-arginina converte-se em L-citrulina e óxido nítrico. Esta síntese é induzida por vários estímulos físicos e químicos, como estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento (*shear stress*), agregação plaquetária, histamina, catecolaminas, aldosterona, vasopressina, bradicinina, adenosina difosfato (ADP), serotonina, acetilcolina, entre outras (MARÍN & RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 1997; MONCADA, PALMER & HIGGES, 1991). São descritas três isoformas da sintase do óxido nítrico: duas constitutivas, presentes em células endoteliais (óxido nítrico sintase endotelial, eNOS) ou em células neuronais (óxido nítrico sintase neuronal, nNOS); e outra isoforma que não se apresenta de forma constitutiva, mas que pode ser induzida por estímulos imunológicos, que levam ao aumento de cálcio intracelular e ativação da expressão em macrófagos, células endoteliais, cardiomiócitos, dentre outros tipos celulares (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

O óxido nítrico promove vasodilatação difundindo-se para o músculo liso vascular e, através da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) promove aumento da concentração intracelular de GMPc (3', 5'-monofosfato de guanosina cíclico). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e, assim, promovendo o relaxamento vascular. Além disso, a PKG atua via canais para K⁺ dependentes de Ca²⁺ e voltagem hiperpolarizando a membrana plasmática, o que promove o relaxamento. Dentre as ações da PKG que também promovem vasodilatação, vale ressaltar a fosforilação do fosfolambam (PLB), a qual deixa de inibir a Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), aumentando a recaptação de cálcio bem como a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLCK), diminuindo sua sensibilidade ao Ca²⁺ (MARÍN & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1997; LINCOLN, DEY & SELLA, 2001).

O óxido nítrico constitui um dos fatores mais importantes na regulação do tônus vascular (MONCADA, PALMER & HIGGES, 1991; MARÍN & RODRÍGUEZ-

MARTÍNEZ, 1997), com reconhecida capacidade vasodilatadora. Este fator liberado pelo endotélio também age inibindo a agregação e a adesão plaquetária e leucocitária à parede vascular (MONCADA, PALMER & HIGGES, 1991; KUBES, SUZUKI & GRANGER, 1991), além de inibir a proliferação celular (GARG & HASSID, 1989).

Estudos corroboram a teoria de que em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) a síntese de NO está normal ou até mesmo elevada, embora sua degradação esteja potencializada devido ao aumento na produção de radicais livres (NAVA, NOLL & LÜSCHER, 1995; BRIONES *et al.*, 1999; 2002).

1.2.2 Espécies Reativas de Oxigênio

O metabolismo aeróbico celular produz várias substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas com moléculas biológicas capazes de causar oxidação, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo as de maior relevância: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot).

A produção de ERO no metabolismo celular é proveniente de diversos mecanismos, entre eles: geração oxidativa de energia pela cadeia mitocondrial (LEE & WEI, 2007), produção de radicais livres pelo citocromo P-450, mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido, a xantina oxidase, mieloperoxidases, ciclooxygenases, lipooxygenases, NOS e as enzimas da família das NADPH oxidases (MUELLER *et al.*, 2005; BEDARD & KRAUSE, 2007; KOH, OH & QUON, 2009; WESELER & BAST, 2010).

No sistema vascular, o ânion superóxido assume destacada relevância entre as EROs, sendo formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases, além de também da NOS desacoplada (WESELER & BAST, 2010; FÖRSTERMANN & SESSA 2012). Após sua formação, o ânion superóxido, além de exercer seus efeitos em diferentes vasos sanguíneos e órgãos, pode dar origem a outras EROs. O ânion superóxido reage com o óxido nítrico, inativando-o e originando o peróxido de nitrito ($ONOO^\cdot$). Por outro lado, através da ação da superoxidodesmutase (SOD), o ânion sueróxido é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode ser convertido em água por ação da glutathiona peroxidase (GPx) ou da catalase.

O H_2O_2 regula vias de sinalização que levam a contração e ao crescimento do músculo liso vascular, migração e inflamação. O H_2O_2 também pode ser metabolizado pela mieloperoxidase e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou também reagir com metais de transição e dar origem ao radical hidroxila (OH^\cdot) (GRIEDLING, SORESCU & USHIO-FUKAI, 2000; SZOCS *et al.*, 2002). A catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetiva quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o H_2O_2 em H_2O e O_2 (CAI, 2005; SINDHU *et al.*, 2005; GONGORA *et al.*, 2006).

Dentre as enzimas oxidantes, a NADPH oxidase pode ser considerada a mais importante fonte geradora de ânion superóxido, sendo descritas sete isoformas; cada uma delas constituída por uma subunidade catalítica (NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4, NOX5, DUOX-1 e DUOX-2) e um máximo de cinco subunidades reguladoras (p22phox, DUOXA1, DUOXA2, p67phox, NOXA1, p47phox, NOXO1 e p40phox) que participam da ativação e organização espacial dos distintos componentes da enzima. As diversas isoformas, que geralmente se definem pela subunidade catalítica que possui, diferenciam-se pela regulação e localização específica, além das EROs que produzem. Assim, NOX-1, NOX-2 e NOX-5 geram ânion superóxido e NOX-4, DUOX-1 e DUOX-2 geram H_2O_2 (DRUMMOND *et al.*, 2011).

As NADPH oxidases constituem uma relevante fonte de EROs nos vasos sanguíneos, sendo que as células endoteliais expressam NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5, as células musculares lisas expressam NOX-1, NOX-4 e NOX-5 e macrófagos e monócitos fundamentalmente NOX-2 (Figura 2). Atualmente considera-se que NOX-1 e NOX-2 podem ser as principais subunidades que contribuem para o estresse oxidativo vascular nas enfermidades cardiovasculares (DRUMMOND *et al.*, 2011).

Muito embora o organismo possa gerar grandes quantidades de EROs, em contrapartida são sintetizadas substâncias antioxidantes que inativam as EROs, levando, assim, ao equilíbrio desse sistema. Desse modo, o estresse oxidativo seria um desarranjo deste equilíbrio, na qual substâncias pró-oxidantes se sobrepõem à capacidade antioxidante do organismo. Além disso, as EROs ativam metaloproteinases e possibilitam uma inclinação do balanço endotelial para a

produção de fatores vasoconstritores, os quais possuem papel fundamental na patogênese de enfermidades vasculares (GRIENDLING & FITZGERALD, 2003).

Um mecanismo notório que influencia as doenças cardiovasculares é a reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, o que leva à diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico e, portanto, aos efeitos vasodilatadores e antiinflamatórios do óxido nítrico; além da formação de peroxinitrito, que contribui para o estresse oxidativo. Além disso, o ânion superóxido também contribui para o processo inflamatório, participando do aumento da expressão de COX-2, presente na hipertensão arterial (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013; ALVAREZ *et al.*, 2007; MARTÍN *et al.*, 2012).

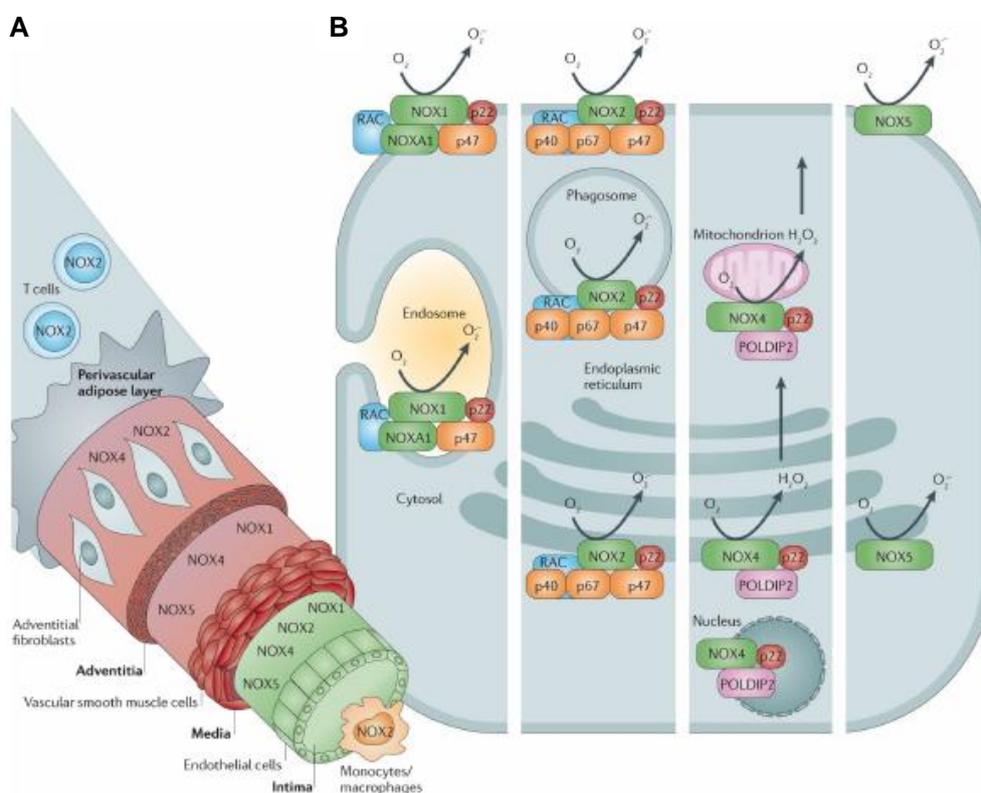


Figura 2 – Expressão celular e intracelular das isoformas da NADPH oxidase na parede do vaso sanguíneo.

A) Diagrama esquemático demonstrando a localização celular (células endoteliais, célula do músculo liso vascular, fibroblastos, macrófagos e células T) das isoformas da NADPH oxidase (NOX-1, NOX-2, NOX-4 e NOX-5) através da seção transversal de uma artéria; B) Diagrama esquemático de uma célula hipotética na qual todas as isoformas da NADPH oxidase (começando com NOX-1 na coluna à esquerda e finalizando com NOX-5 na coluna à direita) estão expressadas em cada uma das suas possíveis localizações intracelulares (Drummond *et al.*, 2011).

1.2.3 Ciclooxygenase-2

Os prostanóides derivados da via da ciclooxygenase podem atuar sobre o leito vascular promovendo tanto a vasoconstrição como a vasodilatação e, por este motivo, estão diretamente relacionados ao controle do tônus e da reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas. A produção destes prostanóides depende da disponibilidade de ácido araquidônico e da atividade das ciclooxygenases e sintases das prostaglandinas (DAVIDGE, 2001; ADEAGBO *et al.*, 2005; ALVAREZ *et al.*, 2005, 2007).

Existem duas isoformas principais da ciclooxygenase, denominadas ciclooxygenase-1 (COX -1) e 2 (COX-2) que realizam a síntese das prostaglandinas e do tromboxano A₂ (TXA₂). A isoforma constitutiva, COX-1, é expressa em muitos tecidos e sintetiza pequenas quantidades de PGs e tem como principal função a manutenção das funções fisiológicas (SMITH *et al.*, 1996). A COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas e possui a expressão relacionada, principalmente, com processos inflamatórios (WU, 1995, ANTMAN *et al.*, 2005). As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em Prostaglandina H₂ e esta por ação de sintases específicas é convertida em prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandina D₂ (PGD₂) ou TXA₂ (MARDINI & FITZGERALD, 2001). Mais recentemente foi descrita a COX-3 (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002), cuja função está relacionada à síntese de prostanóides que medeiam a febre e a dor (SCHWAB *et al.*, 2013).

Os prostanóides, após serem sintetizados, vão se unir a receptores acoplados a proteínas G. Existem oito diferentes tipos de receptores para os prostanóides da COX: EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, IP, FP, DP e TP. A PGE₂ une-se aos receptores EP enquanto a PGI₂ une-se ao IP, a PGF_{2α} une-se ao FP, a PGD₂ une-se ao DP e o TXA₂ une-se ao receptor TP. Após a união com os respectivos receptores os prostanóides vão exercer seus efeitos sobre o leito vascular. Os receptores EP₂, EP₄, IP e DP quando ativados pelos prostanóides estimulam a adenilato ciclase, promovem aumento do AMPc e relaxamento do músculo liso vascular. Os receptores EP₁, EP₃, FP e TP quando ativados promovem a contração do músculo liso vascular por distintos mecanismos. Os receptores EP₁, FP e TP promovem

vasoconstricção pelo aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, enquanto os receptores EP_3 inibem a adenilato ciclase, reduzem os níveis de AMPc e promovem a vasoconstricção (FUNK, 2001; WRIGHT *et al.*, 2001). Apesar da especificidade da maioria dos receptores dos prostanóides derivados da via da COX, o receptor TP (do TXA_2) também pode ser estimulado pelos prostanóides PGE_2 , PGI_2 e $PGF_{2\alpha}$ (WILLIAMS *et al.*, 1994).

Além da participação da COX na manutenção das condições fisiológicas, atualmente é bem conhecida a implicação dos prostanóides derivados desta via no processo patológico de várias doenças que cursam com inflamação, como as cardiovasculares e renais (VANE *et al.*, 1994; SCHONBECK *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2005). Em modelos experimentais de hipertensão foi notada maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina (ALVAREZ *et al.*, 2005).

1.2.4 Sistema Renina-Angiotensina

O SRA constitui um complexo sistema hormonal e exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea e na homeostase dos fluídos corporais. São descritos o SRA circulante e também o SRA local, este, presente em diferentes tecidos como cérebro, rins, córtex da adrenal, coração e vasos sanguíneos (DZAU, 1989; DANSER, 1996; BADER *et al.*, 2001). O SRA participa de modo relevante da função dos sistemas cardiovascular e renal, pois a angiotensina II, principal peptídeo efetor deste sistema, participa do controle do tônus vascular e da manutenção dos níveis de pressão arterial. Adicionalmente, é conhecido que o SRA local ou tecidual refere-se a um sistema peptidérgico com características de uma glândula endócrina (PAUL *et al.*, 2006).

O substrato do sistema renina-angiotensina é uma a-glicoproteína chamada angiotensinogênio que é liberada pelo fígado na circulação e por ação da renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins, é clivado em um decapeptídeo chamado angiotensina I. Este decapeptídeo por sua vez sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), que é expressa principalmente nas células endoteliais do pulmão, e é transformado em um octapeptídeo chamado angiotensina II. Foi identificada posteriormente outra enzima participante deste sistema, uma carboxipeptidase, denominada enzima conversora da angiotensina II (ECA II) que

cliva tanto a angiotensina I como a angiotensina II em um metabólito chamado angiotensina 1-7. Tanto a ECA I como a ECA II são importantes no controle dos níveis de angiotensina II (CRACKOWER, *et al.*, 2002; DANILCZYK & PENNINGER, 2006).

A angiotensina II pode atuar diretamente sobre receptores específicos localizados nas células do músculo liso vascular ou de modo indireto, através da liberação de aldosterona pela estimulação da adrenal (QUINN & WILLIAMS, 1988; HACKENTHAL, *et al.*, 1990; DESCHEPPER, 1994; HALL, 2003; PERSSON *et al.*, 2004). A angiotensina II atua em dois tipos de receptores: receptor da angiotensina tipo 1 (AT₁), e da angiotensina tipo 2 (AT₂). A ação da angiotensina II sobre os receptores AT₁ são as que caracterizam seus efeitos mais conhecidos, de vasoconstrição e aumento da proliferação e do crescimento celular, entretanto, os receptores AT₂, quando estimulados, antagonizam os efeitos dos receptores AT₁ (GRIEDLING, *et al.*, 1996; STECKELINGS *et al.*, 2005).

A angiotensina II exerce importante ação pró-inflamatória na parede vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (OHNAKA *et al.*, 2000; SCHIFFRIN, 2005; PAULETTO & RATAZZI, 2006; ALVAREZ *et al.*, 2007; SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007; BELTRÁN *et al.*, 2009) que participam das respostas inflamatórias presentes nas doenças vasculares. Autores descreveram que este peptídeo pode levar à migração e à proliferação de CMLVs, estimulando o processo inflamatório nestas células (BOMFIM *et al.*, 2011).

A angiotensina II pode regular a produção de prostanóides e a expressão da COX-2 em células do músculo liso vascular (OHNAKA *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2002, ALVAREZ *et al.*, 2007; PÉREZ-GIRÓN *et al.*, 2014) e em fibroblastos adventiciais através da ativação dos receptores AT₁ (BELTRÁN *et al.*, 2009). Sabe-se que a angiotensina II ativa a NADPH oxidase, levando ao aumento do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, exercendo relevante efeito sobre o leito vascular através da indução do estresse oxidativo (CAI *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2005).

Desse modo, alterações no SRA estão associadas ao desenvolvimento de doenças como aterosclerose, insuficiência renal e cardíaca e, conforme objeto do

nosso estudo, hipertensão arterial (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996; GRIENGLING, SORESCU & USHIO-FUKAI, 2000; OHTSU *et al.*, 2005), contribuindo para as características inflamatórias deste processo patológico, sobretudo, através da angiotensina II.

1.3 RESPOSTA IMUNE E HIPERTENSÃO ARTERIAL

Doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial, têm sido consideradas um processo inflamatório crônico por diversos pesquisadores (BAUTISTA *et al.*, 2005; SAVOIA & SCHIFFRIN, 2006; 2007; PAULETTO & RATTAZZI *et al.*, 2006; SCHIFFRIN, 2013; 2014).

A etiologia da inflamação é muito variada, embora os mecanismos de instalação das lesões sejam comuns, nos quais o agente inflamatório atua sobre os tecidos induzindo a liberação de mediadores que agem nos receptores existentes nas células da microcirculação e dos leucócitos. Células endoteliais e CMLVs participam de mecanismos patogénicos de muitas lesões inflamatórias, pois podem ser ativadas por inúmeros estímulos, como citocinas inflamatórias, variações de fluxo e pressão sanguínea, entre outros mediadores (PEREIRA & BOGLIOLO, 1998).

Nesse contexto, estudos relatam um aumento dos níveis circulantes de moléculas inflamatórias como citocinas, proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) HSP 60 e HSP70, angiotensina II e proteína C reativa em animais SHR e pessoas com hipertensão arterial (BAUTISTA *et al.*, 2001; SANZ-ROSA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2008). Há casos em que a proteína C reativa pode colaborar com o prognóstico da hipertensão arterial, dada sua extrema importância no recrutamento e ativação de leucócitos, essenciais na resposta imune, no controle de infecções e no reparo dos tecidos lesionados (SESSO *et al.*, 2003). Os leucócitos ativados, por sua vez, influenciam a resistência microvascular e liberam EROs e enzimas proteolíticas, o que pode levar à lesão da parede vascular (OFOSU-APPIAH *et al.*, 2007).

A imunidade inata representa uma resposta do sistema imune inicial, rápida e estereotipada a um número grande de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000; MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT & JANEWAY, 1997). Por outro lado, a resposta imune adaptativa expande os mecanismos de defesa, quando necessário, ativando células

especializadas, os linfócitos, e, conseqüentemente, as moléculas por eles produzidas (DELVES & ROITT, 2000).

Considera-se como função primária do sistema imune a detecção e proteção do hospedeiro contra o perigo causado por danos celulares e teciduais, e pelo estresse metabólico, os quais são capazes de ativar as células da resposta imune inata. Acredita-se que os sinais de alerta constitutivos, como a morte celular programada, não funciona como perigo, ao contrário dos sinais de alerta induzidos, como substâncias geradas ou modificadas por células danificadas. Tais substâncias são denominadas de *padrões moleculares associados ao dano* (DAMP, *damage-associated molecular pattern*), os quais são reconhecidos por receptores que desencadeiam a resposta imune inata, como os Receptores Tipo Toll (TLRs) (MATZINGER, 2002a; 2002b). Já foram relatados diversos DAMPs envolvidos na hipertensão arterial, bem como células do sistema imune, principalmente, do sistema imune adaptativo (HARRISON *et al.*, 2010).

Em relação à resposta imune adaptativa, os linfócitos T foram descritos na hipertensão inicialmente por estudos que demonstraram que camundongos sem linfócitos T e B eram resistentes ao aumento da pressão arterial frente ao tratamento com angiotensina II ou DOCA-sal (desoxicorticoesterona-salina). Diante da transferência de linfócitos T, a hipertensão dos animais foi restaurada. Posteriormente, foi demonstrada a importância dos linfócitos T CD8 na hipertensão induzida por angiotensina II (GUZIK *et al.*, 2007; CROWLEY *et al.*, 2010), além da participação de citocinas inflamatórias produzidas pelas células T (MADHUR *et al.*, 2010), além de outros trabalhos descrevendo o envolvimento de mediadores da resposta imune adaptativa em modelos de hipertensão induzida por angiotensina II ou DOCA-sal (LOHR *et al.*, 2006; BARHOUMI *et al.*, 2011).

Conforme mencionado, diversos trabalhos relatam o envolvimento da resposta imune adaptativa na hipertensão arterial, entretanto, a importância da resposta imune inata, responsável pelo reconhecimento e apresentação dos antígenos para os linfócitos, tem sido pouco investigada (EISSLER *et al.*, 2011; BOMFIM *et al.*, 2012; SOLLINGER *et al.*, 2014).

1.4 RECEPTORES TIPO TOLL

Os receptores Tipo Toll (TLRs) constituem a primeira linha de defesa de mamíferos contra microorganismos invasores e, quando ativados, podem iniciar a resposta imune inata e, subsequentemente, a adaptativa, ambas responsáveis por desencadear a resposta inflamatória.

Os TLRs representam uma importante família de proteínas transmembrânicas caracterizadas estruturalmente pela presença de regiões com repetições ricas em leucina (LRR, *leucine rich repeat*) e cisteínas na região extracelular, e um domínio TIR (*Toll-Interleukin-1 receptor*) intracelular. Em ratos e camundongos foram identificados 13 tipos de TLRs (TLR 1-13) e, em humanos, a família dos TLRs consta de 10 membros (TLR 1-10) (BOSSHART & HEINZELMANN, 2007; MICHELSEN *et al.* 2004; YAMAMOTO & TAKEDA, 2010; KAWAI & AKIRA, 2010). Alguns desses receptores estão distribuídos pela superfície celular enquanto outros se encontram no interior da célula, de modo que podem reconhecer e responder frente a um amplo número de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*), tais como lipoproteínas bacterianas, RNA viral e lipopolissacarídeo. Todavia, conforme já descrito, além dos microorganismos, receptores tipo Toll podem também ser ativados por moléculas endógenas, os DAMPs, já mencionados.

Em linhas gerais, o reconhecimento e a ativação dos TLRs através de moléculas endógenas, por desencadear uma resposta imune e, conseqüentemente uma resposta inflamatória, sugere um elo importante entre a imunidade e as doenças cardiovasculares, como aterosclerose, infarto do miocárdio, disfunção cardíaca em sepse e insuficiência cardíaca congestiva; e também entre a imunidade e as doenças metabólicas que cursam com disfunção vascular, como diabetes e obesidade, sendo que a inibição dos TLRs sugere um efeito protetor diante destas condições patológicas (FRANTZ, ERTL & BAUERSACHS, 2007).

1.4.1 Receptores tipo Toll 4 (TLR4) e resposta inflamatória

Entre os membros da família dos TLRs, o TLR4 é um receptor importante na mediação da resposta inflamatória, o qual se encontra expressado na superfície de diversos tipos celulares, incluindo células do endotélio vascular e CMLVs. Após

ativação, como os demais TLRs, o TLR4 pode desencadear o sistema imune inato e adaptativo, cujos mecanismos estão envolvidos na inflamação (TSAN & GAO, 2004; KAWAI & AKIRA, 2010).

O TLR4 pode reconhecer e responder ao LPS, seu ligante característico, que é o glicolípido da parede celular de bactérias Gram-negativas. Este receptor também é capaz de reconhecer e gerar resposta diante de compostos não infecciosos, dentre os quais: proteínas de choque térmico (HSP, *heat shock protein*), proteínas do grupo de alta mobilidade Box 1 (*HMGB1, high mobility group box 1 protein*) e componentes da matriz extracelular produzidos em resposta à morte e / ou aos danos celulares – DAMPs –, tais como fibronectina, heparan sulfato e fibrinogênio (PICCININI & MIDIWOOD, 2010).

O LPS, ao se associar com a proteína plasmática de união ao LPS, a LPB (*LPS-binding protein*), forma um complexo que é reconhecido pelo receptor de membrana CD14, através do qual se ativa TLR4. A via de sinalização do TLR4 depende da presença do seu co-receptor MD2 (*myeloid differentiation receptor 2*), que é uma glicoproteína de membrana que se associa ao domínio extracelular de TLR4, uma região com LRR. Uma vez ativado, o TLR4 sofre modificações conformacionais, permitindo o recrutamento de moléculas adaptadoras, dentre elas, o fator de diferenciação mielóide 88 (*MyD88, myeloid differentiation factor 88*), caracterizando a via dependente de MyD88, cuja cascata resulta na ativação precoce do fator nuclear (*nuclear factor, NF*) κ B, o NF- κ B. Por outra via, independente de MyD88, a sinalização de TLR4 leva à ativação tardia de NF- κ B. O tipo de sinalização que será desencadeada por TLR4 irá depender do uso seletivo de diferentes combinações de moléculas adaptadoras (AKIRA & HOSHINO, 2003; KAWAI & AKIRA, 2010) (Figura 3).

A via dependente de MyD88 inicia-se quando o domínio intracelular de TLR4, TIR, que divide homologia com o receptor da interleucina (IL-1) -, associa-se à MyD88 através da proteína adaptadora TIRAP (*TIR associated protein*). Ocorre, então, a associação de MyD88 com a quinase associada ao receptor IL-1, IRAK4 (*IL-1 receptor-associated kinase*), favorecendo a fosforilação da IRAK1, cujo complexo combina-se à molécula TRAF6 (*tumoral necrosis factor (TNF) receptor associated factor*). O complexo IRAK-TRAF6 se dissocia, então, do receptor TLR4, ativando diversas quinases. Assim, a ligação da TRAF6 é capaz de ativar TAK1

(*tumoral growth factor β (TGF- β) activated kinase 1*), formando um complexo com TAB1 e TAB2 (*TAK binding protein, TAB*). Consequentemente, TAK1 ativa o complexo I κ B quinase (IKK, *I κ B kinase*), levando à ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1 (*activator protein-1, AP-1*), que controla a transcrição de genes pró-inflamatórios, como as formas induzíveis da ciclooxigenase, COX-2, e da sintase do óxido nítrico, iNOS. Simultaneamente, TAK 1 ativa diferentes proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPk), como ERK 1/2 (quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular), JNK (*JUN N-terminal kinase*) e p38, o que promove indução de citocinas pró-inflamatórias (BOSSHART & HEINZELMANN, 2007; MICHELSEN *et al.* 2004; YAMAMOTO & TAKEDA, 2010; KAWAI & AKIRA, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Por outro lado ocorre a via não dependente de MyD88, através da qual a sinalização do TLR4 leva à ativação tardia de NF- κ B. Esta via inicia-se quando o receptor TLR4 recruta a molécula adaptadora TRAM (*Toll-receptor associated molecule*) (também conhecida como TICAM-2) e o seu domínio intracelular (TIR) que induz o interferón (IFN) β , denominado de TRIF ou TICAM-1. Esta sinalização não dependente de MyD88 contribui não somente para a ativação tardia de NF- κ B e citocinas inflamatórias, mas também para a indução do fator regulador de IFN 3 (IRF3), um fator de transcrição que induz genes de interferon tipo I, tais como IFN- β e IP-10 (proteína 10 induzível por IFN- γ). Nesta via também são ativados diferentes membros da família das MAPk, incluindo p38 e JNK, as quais estão implicadas na transcrição de genes e na regulação da estabilidade de RNAm (BOSSHART & HEINZELMANN, 2007; YAMAMOTO & TAKEDA, 2010; KAWAI & AKIRA, 2010; WANG *et al.*, 2010).

Foi também demonstrado que, diante da ativação do TLR4, LPS pode produzir EROs, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (ASEHNOUNE *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2006; PACQUELET *et al.*, 2007). As EROs geradas a partir da ativação do TLR4 provêm, principalmente, da NADPH oxidase e da mitocôndria (WEST *et al.*, 2011).

Outra importante molécula inflamatória que pode ser ativada através do estímulo do TLR4 é a COX-2, que, neste caso, irá regular a produção de prostaciclina (KUPER, BECK & NEUHOFER, 2012).

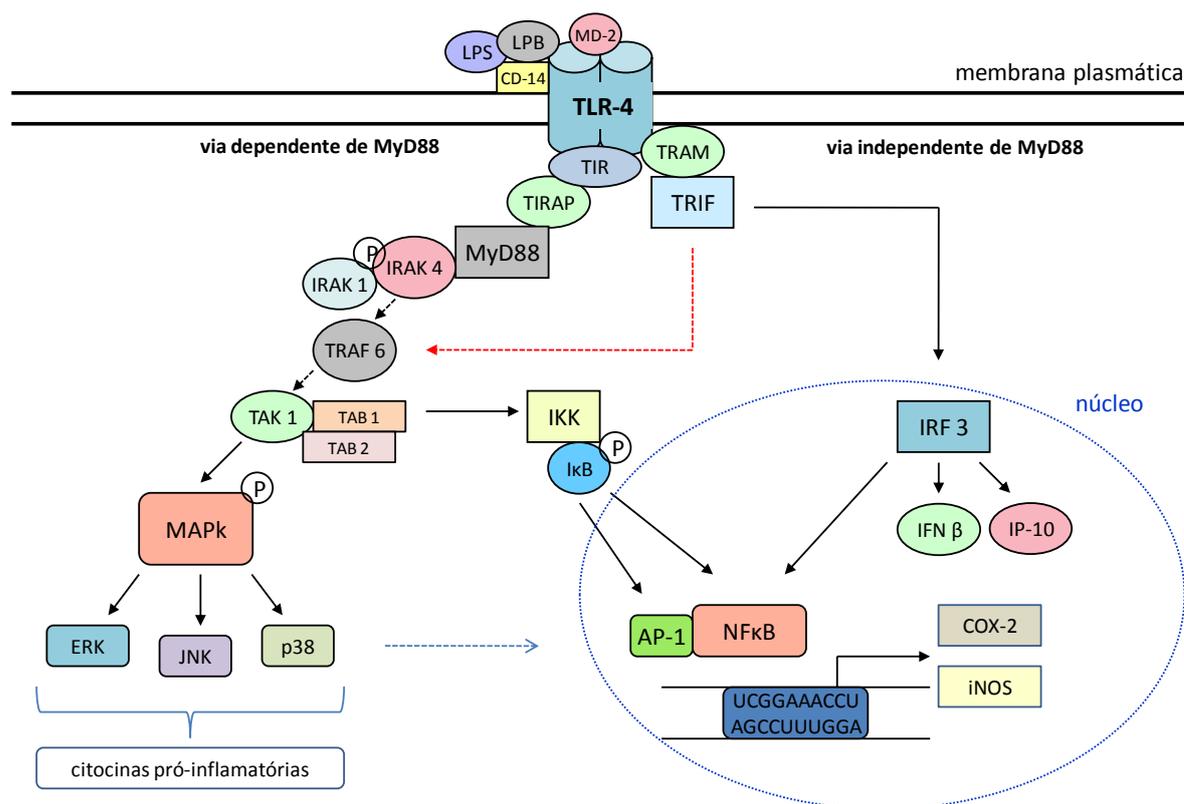


Figura 3 – Esquema ilustrativo das vias de sinalização ativadas por TLR4, a via dependente de MyD88 e a via independente de MyD88, que representam a ativação precoce e tardia de NF-κB, respectivamente.

LPS: lipopolissacarídeo; LPB: proteína de ligação ao LPS; MD-2: receptor de diferenciação mielóide 2; TLR4: receptor tipo Toll 4; TIR: receptor Toll/Interleucina-1; TIRAP: proteína associada a TIR; IRAK: quinase associada ao receptor Interleucina-1 (IL-1); TRAF: fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF); TAK: quinase ativada pelo fator de crescimento tumoral (TGF); TAB: proteína de ligação à TAK; IKK: IκB quinase; NF-κB: fator nuclear κB; AP-1: proteína ativadora-1; COX-2: ciclooxigenase-2; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; MAPk: proteínas quinases ativadas por mitógeno; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; JNK: quinase JUN N-terminal; TRAM: molécula associada ao receptor Toll; TRIF: domínio intracelular que induz interferón; IFN 3: interferon 3; IRF3: fator regulador de IFN 3; IP-10: proteína 10 induzível por IFN-γ.

Considerando o aumento de citocinas inflamatórias e a indução de genes próinflamatórios, como COX-2 e iNOS, bem como a produção de EROs, a resposta imune desencadeada por TLR4, levando a ativação complexa e multidirecionada de uma cascata inflamatória, pode atribuir a este receptor um importante papel no desenvolvimento da inflamação observada em doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial.

1.4.2 Receptores tipo Toll 4 (TLR4) e doenças cardiovasculares

Existem numerosas evidências de que a via de sinalização dos TLRs e a imunidade inata contribuem para o processo inflamatório presente no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Neste contexto, foi observado que a placa de ateroma é caracterizada pelo acúmulo de numerosos ligantes endógenos do TLR4, na qual foi detectada o aumento da expressão desse receptor, principalmente em células endoteliais, macrófagos e fibroblastos adventiciais (COLE *et al.*, 2010). Também tem sido observado um incremento da expressão de TLR4 em CML Vs de artérias coronárias ateroscleróticas humanas (OTSUI *et al.*, 2007), assim como em monócitos circulantes de pacientes com aterosclerose coronariana (GENG *et al.*, 2006). Além de contribuir para a patogênese da aterosclerose, o TLR4 também participa da desestabilização da placa de ateroma (DEN DEKKER *et al.*, 2010), entre outras evidências da participação desse receptor na doença aterosclerótica (EDFELDT *et al.*, 2004; SALES *et al.*, 2010).

Outro processo patológico que também tem sido associado com os TLRs é a diabetes, na qual está presente um aumento da expressão de TLR4, bem como de suas moléculas adaptadoras, como MyD88 e TRIF, além de aumento na fosforilação de IRAK-1 e NF- κ B, e também de ligantes de TLR4, como HSP60 (SONG *et al.*, 2006; DEVARAJ *et al.*, 2008; DASU *et al.*, 2010). Essa ativação de TLR4 na diabetes parece ser desencadeada pela hiperglicemia, posto que em monócitos humanos altas concentrações de glicose aumentam a via de sinalização de TLR4/MyD88/IRAK-1/ NF- κ B através de estimulação de NADPH oxidase (DASU *et al.*, 2008).

A sinalização celular de TLR4 também tem sido implicada na pré-eclâmpsia, enfermidade caracterizada por hipertensão e proteinúria, que aparece na segunda metade da gestação. Estudos sugerem que a excessiva resposta inflamatória sistêmica materna, juntamente com exacerbada ativação do sistema imune inato durante a gestação, pode estar relacionada à patogênese desta doença, ainda não esclarecida. Relatos evidenciam que o TLR4 encontra-se mais expressado na pré-eclâmpsia, bem como NF- κ B, somados a um desequilíbrio da liberação de citocinas inflamatórias (FAAS *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 2005; XIE *et al.*, 2010a; 2010b).

Outra doença cardiovascular cuja participação do TLR4 foi descrita é o infarto do miocárdio, sendo observada maior expressão desse receptor no músculo cardíaco em casos avançados da doença (FRANTZ *et al.*, 1999). A participação desse receptor na inflamação vascular também já foi descrita na obesidade (KIM *et al.*, 2007) e no fenômeno isquemia-reperusão (CHONG *et al.*, 2004; OYAMA *et al.*, 2004).

Um dos primeiros estudos que associaram a elevação da pressão arterial com o receptor TLR4 preocupou-se com os danos cardíacos, demonstrando que houve redução da hipertrofia cardíaca em camundongos knockout para TLR4 submetidos à coarctação da aorta (HA *et al.*, 2005). Dados clínicos já demonstraram que o polimorfismo Asp299Gly no gene do TLR4 está associado com hipertrofia ventricular esquerda (SALES *et al.*, 2010).

Em 2011, um estudo demonstrou que a expressão do TLR4 está aumentada no coração de ratos hipertensos quando comparada a de ratos normotensos de mesma idade (EISSLER *et al.*, 2011). Recentemente, outros relatos do envolvimento do TLR4 sugerem que o sistema imune inato desenvolva um papel fundamental na hipertensão (BOMFIM *et al.*, 2012; SOLLINGER *et al.*, 2014), o que indica que o TLR4 pode constituir um importante mecanismo no controle da função cardiovascular em condições patológicas.

Associado a isso, o tratamento com ramipril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina II, foi capaz de reduzir a expressão de TLR4 em ratos com hipertensão induzida por L-NAME (EISSLER *et al.*, 2011), sugerindo a participação deste peptídeo nos elevados níveis de TLR4. Outros estudos também já descreveram que a angiotensina II induz a expressão de TLR4 em diferentes tipos celulares (WOLF *et al.*, 2006; OTSUI *et al.*, 2007; LV *et al.*, 2009; JI *et al.*, 2009a; 2009b; WU *et al.*, 2009), o que demonstra que a expressão de TLR4 pode ser modulada por um importante mecanismo de controle da pressão arterial, que é o SRA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a ativação do TLR4 devido ao incremento do Sistema Renina-Angiotensina contribui para a hipertensão arterial e para as alterações vasculares observadas em ratos SHR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Verificar se a expressão vascular do TLR4 está alterada no modelo de hipertensão arterial SHR e se a angiotensina II participa dessa alteração.

2) Investigar a contribuição do TLR4 para o aumento da pressão arterial bem como para as alterações vasculares observadas em ratos SHR.

3) Estudar o envolvimento da produção de espécies reativas de oxigênio ativadas por TLR4 na função vascular de ratos hipertensos

4) Investigar a participação do TLR4 sobre as alterações causadas por Angiotensina II em células de músculo liso vascular de ratos SHR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os protocolos experimentais realizados no Brasil foram autorizados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o protocolo nº 042/2013. Os demais experimentos foram desenvolvidos durante período de doutorado sanduíche (março de 2012 a junho de 2013) realizado na *Universidad Rey Juan Carlos – Facultad de Ciencias de La Salud* (Madri, Espanha), em parceria com a *Universidad Autónoma de Madrid - Facultad de Medicina* (Madri, Espanha), cujo *Comité de Ética de la Investigación* (CEI UAM 31 - 759) aprovou a realização desta pesquisa. Todos os procedimentos experimentais estão em conformidade com os princípios éticos para experimentação animal adotados pelas Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental, pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), pela Comunidade Européia, por leis espanholas e européias (RD 233/88 *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación* e 609/86), bem como pelo *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) e ratos SHR (*spontaneously hypertensive rats*) machos, com três meses de idade. Para realização dos protocolos de reatividade vascular, ratos SHR e Wistar foram fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES (Vitória, Brasil). Os demais procedimentos experimentais utilizaram ratos Wistar e SHR cedidos pelo biotério da *Universidad Autónoma de Madrid - Facultad de Medicina* (Madri, Espanha). Os animais provenientes de ambos os biotérios permaneciam em gaiolas com temperatura e umidade constantes, além de ciclo claro-escuro de 12 / 12 horas, com livre acesso a ração e água.

A cepa SHR, desenvolvida por Okamoto & Aoki (1963), caracteriza-se por um modelo de hipertensão arterial crônica, determinada geneticamente. Tem sido largamente utilizada para investigações sobre a hipertensão devido às semelhanças do desenvolvimento da hipertensão arterial humana essencial primária

Inicialmente, foi investigado se a hipertensão arterial cursa com aumento da expressão de RNA mensageiro (RNAm) do receptor TLR4 e, em sequência, se o SRA participa desta possível alteração. Para isso, foram usados ratos Wistar controles e também ratos SHR não tratados e tratados com losartan, antagonista do receptor AT₁ (15 mg / Kg · dia, na água de beber), durante 12 semanas. Para calcular esta dose, foi feito um acompanhamento por 30 dias para avaliar a quantidade de água que os ratos SHR bebiam a cada dia, sendo observado um volume de 20 a 45 mL de água / dia / rato SHR. Esses animais, de aproximadamente 26 semanas de idade ao final do tratamento, foram agrupados nos grupos: Wistar controle (n = 8), SHR controle (n = 16) e SHR losartan (n = 7), respectivamente, dos quais foi, então, aferida a pressão arterial indiretamente através de pletismografia na artéria caudal e foram obtidos segmentos e CMLVs de aorta torácica para medidas de RNAm de TLR4. Os segmentos de aorta dos ratos do grupo Wistar e SHR controles também foram usados para identificação do receptor TLR4 através de imunofluorescência.

Na seguinte sequência de experimentos, foi pesquisado se o receptor TLR4 influencia a hipertensão arterial e as alterações vasculares funcionais associadas a esse processo patológico. Para alcançar este objetivo, foram utilizados ratos SHR

tratados com anticorpo anti-TLR4 (sc-13591, monoclonal IgG_{2a}) e também ratos Wistar e SHR tratados com anticorpo IgG_{2a} não-específico (sc-2026), ambos anticorpos administrados a concentração de 1 µg / dia diluído em salina, via intraperitoneal, durante 14 dias. Esses animais, com cerca de 13 semanas de idade ao final do tratamento, foram alocados nos seguintes grupos: Wistar IgG (n = 10), SHR IgG (n = 9) e SHR anti-TLR4 (n = 10). O anticorpo IgG_{2a} não-específico foi utilizado como controle por descartar os efeitos não específicos do tratamento com anticorpo anti-TLR4 (BOMFIM, *et al.*, 2012). Destes animais foram registradas medidas hemodinâmicas diretas *in vivo* e obtidos anéis de aorta torácica para os experimentos de reatividade vascular *in vitro*, para avaliar a função vascular.

Dando continuidade às investigações, CMLVs do mesmo grupo SHR controle já mencionado (n = 16) foram extraídas e cultivadas com o objetivo de elucidar a influência da angiotensina II sobre a expressão de TLR4 e, mais profundamente, a influência do TLR4 sobre os efeitos da angiotensina II em ratos hipertensos. Para isso, após a cultura celular foram realizadas medidas de RNAm, de expressão proteica, de atividade de NADPH oxidase, de produção de ânions superóxidos, além de protocolos de avaliação da migração e proliferação celular.

Na Figura 4 foram esquematizados, de forma resumida, todos os protocolos experimentais realizados.

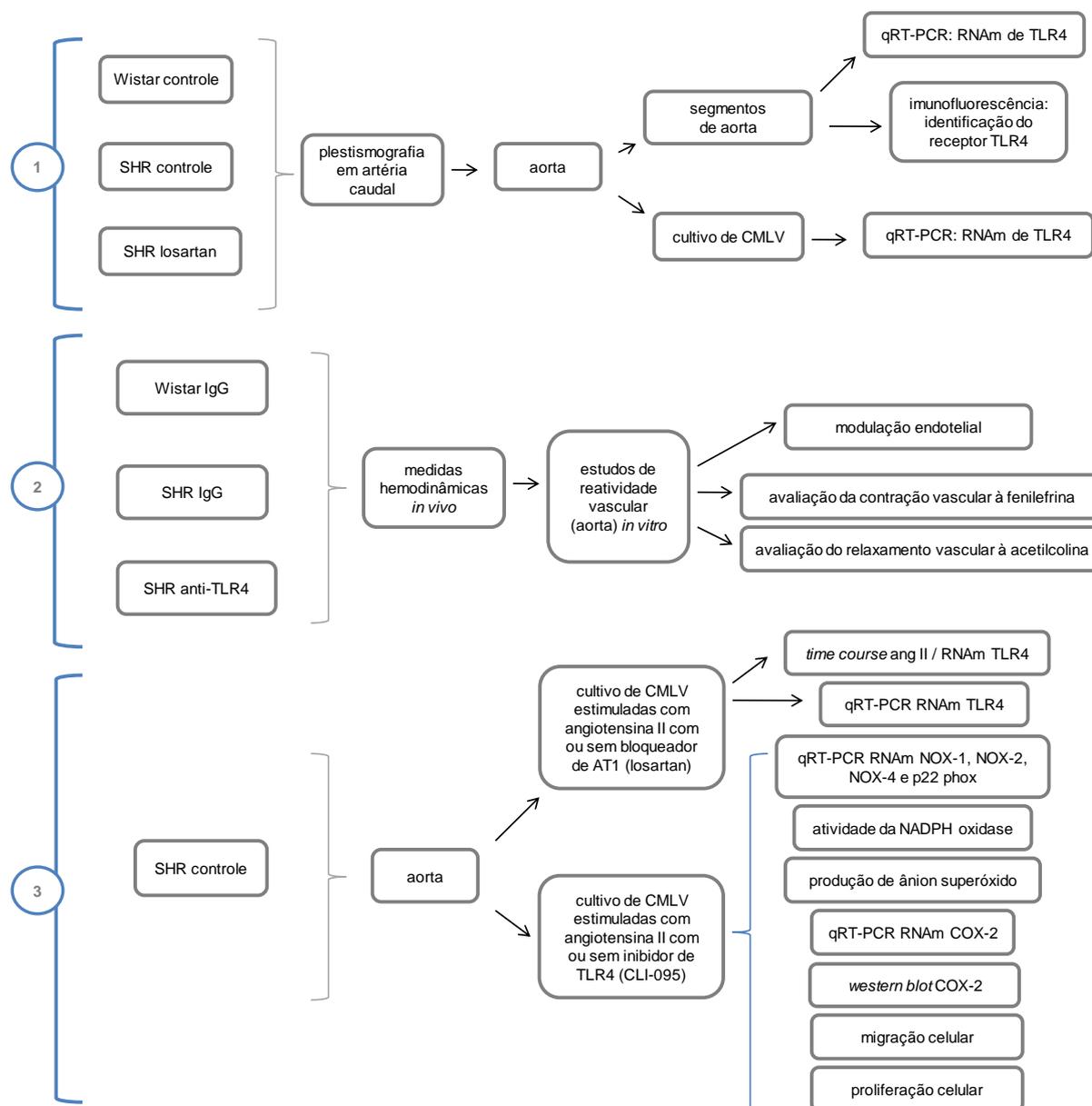


Figura 4 – Esquema representativo dos grupos de animais utilizados no presente estudo, bem como dos respectivos protocolos experimentais desenvolvidos, na seqüência em que foram analisados:

1) experimentos com animais dos grupos Wistar controle ($n = 8$), SHR controle ($n = 16$) e SHR losartan ($n = 7$); 2) experimentos realizados com ratos dos grupos Wistar IgG ($n = 10$), SHR IgG ($n = 8$) e SHR IgG ($n = 9$); 3) protocolos desenvolvidos a partir do cultivo de células de músculo liso de aorta de animais do grupo SHR controle já mencionado. Número de animais experimentais expressados por n .

3.3 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos do grupo Wistar controle, SHR controle e SHR losartan foi aferida pelo método não-invasivo de pletismografia na artéria caudal (BUÑAG, 1973), para o qual utilizamos o equipamento NIPREM 645 (*Cibertec*, Madri, Espanha). A cada duas semanas foram obtidas as medidas de PAS dos ratos SHR controle e SHR losartan (15 mg / Kg · dia, na água de beber, por 12 semanas). Como os ratos Wistar não foram submetidos ao tratamento com losartan, a PAS destes animais somente foi mensurada antes da extração da aorta torácica, realizada em todos os ratos para execução de experimentos, após as 12 semanas de tratamento do grupo SHR losartan.

Para o registro pressórico, os animais inicialmente eram colocados no interior de uma estufa a 37 °C, por um período de 15 minutos, a fim de promover dilatação da artéria caudal. Em seguida, um manguito de pressão e um sensor de pulso eram conectados à cauda desses animais. A medida indireta de pressão arterial com este método é basicamente semelhante ao método utilizado em humanos, com esfigmomanômetro, ou seja, a PAS é detectada através da onda de pulso que surge após o colapso da artéria dado pela insuflação do manguito de pressão.

Foram realizadas dez medidas em cada animal, das quais foi obtida a média aritmética da PAS de cada animal. Antes do início das medidas pressóricas propriamente ditas, os animais eram submetidos a um período de uma semana para aclimação. Esta adaptação era efetuada colocando-se os animais na estufa e mimetizando-se todo o método de mensuração da pressão arterial, com o objetivo de reduzir o estresse dos animais e, conseqüentemente, amenizar as possíveis interferências ambientais durante o momento de obtenção dos valores pressóricos.

Este protocolo foi realizado com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento com losartan sobre os valores pressóricos e de FC dos animais hipertensos acordados, sem os possíveis efeitos depressores dos anestésicos. Além de permitir a comparação entre os valores de pressão arterial e de FC entre ratos Wistar e SHR.

O peso dos animais também foi mensurado a cada duas semanas, ao longo das 12 semanas de tratamento.

Após o tratamento e obtenção dos valores de PAS, ratos de todos os grupos supracitados (Wistar controle, SHR controle e SHR losartan) tiveram a aorta torácica removida para medida de RNAm e para imunofluorescência. Esses protocolos serão descritos posteriormente.

3.4 MEDIDA DIRETA DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Os ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 tiveram seu peso corporal registrado antes (dia 0), durante (dia 7) e após (dia 15) o tratamento com anticorpo feito por 14 dias. Ao final deste tratamento, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g / Kg de peso corporal) através de injeção intraperitoneal, e submetidos à cirurgia para cateterização da artéria carótida direita. O plano anestésico foi cautelosamente avaliado antes e durante o procedimento através da responsividade ao reflexo doloroso e da monitorização da FC e, quando necessário, houve suplementação da dose de anestésico utilizada. O rato, então, era colocado em uma mesa cirúrgica adequada para ratos, feita com uma superfície plana de madeira. A pele sobre o lado ventral do pescoço, onde foi feita a incisão cirúrgica, foi cuidadosamente limpa e desinfetada com álcool 70 %.

A artéria carótida direita foi identificada juntamente com o nervo vago, ao lado direito da traquéia, sendo separada delicadamente do tecido conjuntivo adjacente e do nervo vago, com o cuidado de não estimulá-lo. A artéria, então, foi cateterizada usando uma cânula de polietileno PE-50 (*Intramedic Polyethylene Tubing, Clay Adams, Becton, Dickinson and Company, Nova Jérsei, EUA*) preenchida com solução de heparina (50 UI/mL). A outra ponta da cânula ficava conectada a uma seringa com uma pequena torneira de três vias (Embramed, São Paulo, Brasil). Em seguida, o local da canulação da artéria carótida foi amarrado com um fio sem obstruir o fluxo de sangue (PARASURAMAN & RAVEENDRAN, 2012).

Os parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial e FC foram obtidos através da onda de pulso arterial detectada por um transdutor de pressão (TSD 104A, *BIOPAC Systems, Inc., Califórnia, EUA*) conectado ao sistema de aquisição de dados biológicos (MP 30 *BIOPAC Systems, Inc., Califórnia, EUA*), utilizando taxa de amostragem de 2000 amostras / segundo. Esses dados eram enviados ao computador e processados, como pode ser observado em um dos registros obtidos no presente estudo (Figura 5).

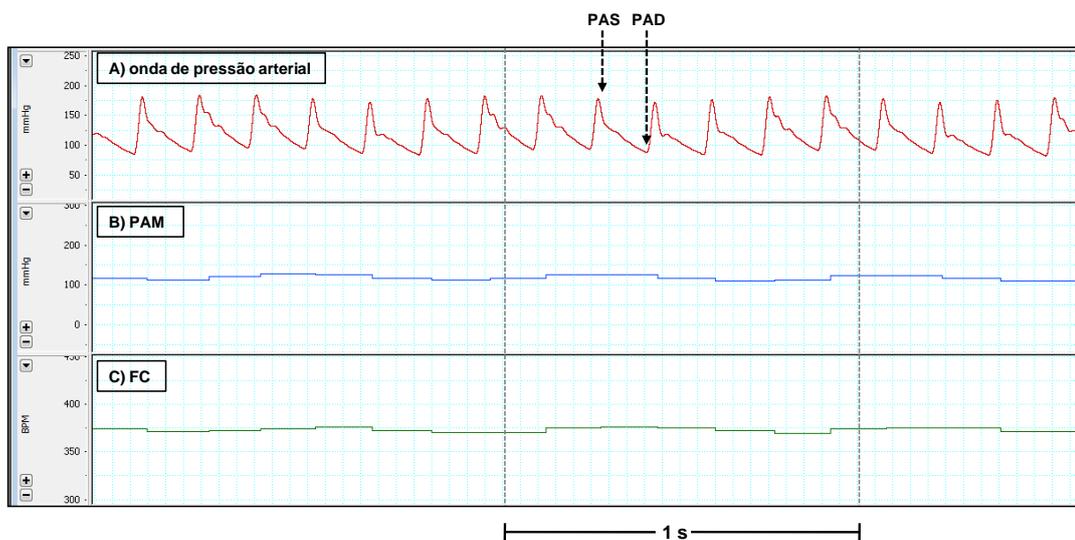


Figura 5 – Registros de parâmetros hemodinâmicos de um rato SHR IgG (usado como controle do tratamento com anti-TLR4) demonstrando:

A) a onda de pulso arterial, pela qual é obtida a Pressão Arterial Sistólica (PAS) e a Pressão Arterial Diastólica (PAD), em mmHg; B) a Pressão Arterial Média (PAM), em mmHg; e C) o registro de Frequência Cardíaca (FC), em batimento por minuto (bpm). No eixo vertical está representado o tempo, demonstrando o intervalo de 1 segundo.

Após um período de estabilização de 30 minutos foram registradas as ondas de pulso arterial, a partir da qual foi obtida a pressão arterial sistólica (PAS), a pressão arterial diastólica (PAD) e a pressão arterial média (PAM), e também as medidas de frequência cardíaca (FC).

Este protocolo foi realizado com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento com anticorpo anti-TLR4 sobre os valores pressóricos e de frequência cardíaca dos animais hipertensos.

3.5 REATIVIDADE VASCULAR

Após a realização das medidas hemodinâmicas descritas acima, os animais dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 tiveram sua função vascular investigada através de estudos de reatividade vascular *in vitro* com segmentos de aorta em preparação de banho de órgãos (NIELSEN & OWMAN, 1971; MARÍN, SÁNCHEZ-FERRER & SALAICES, 1988). A finalidade desses estudos foi avaliar se a inibição do TLR4 (através do tratamento com anti-TLR4) influencia a reatividade vascular, além de conhecer possíveis fatores vasoativos envolvidos.

Os ratos, já anestesiados, foram sacrificados por decapitação seguida de exsanguinação, sendo feitos todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais de experimentação. O tórax foi aberto e o coração cuidadosamente removido para obtenção do peso do órgão, com a finalidade de se estimar a hipertrofia cardíaca. O comprimento da tíbia, obtido para estimar o crescimento osso, foi mensurado por paquímetro, sendo utilizado para normalização do peso do coração em relação ao crescimento do animal e, assim, determinar a possível hipertrofia cardíaca. Contudo, a razão entre o peso seco do coração e o comprimento da tíbia foi calculada. A tíbia foi removida após a extração da aorta, descrita a seguir.

A aorta torácica foi cuidadosamente removida com auxílio de pinças e uma pequena tesoura, e colocada em uma placa de Petri com solução fria (4°C) de Krebs-Henseleit: 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄.7H₂O, 2,5 mM CaCl₂.2H₂O, 1,2 mM KH₂PO₄, 11,1 mM glicose e 0,01 mM Na₂EDTA). A aorta foi, então, delicadamente manipulada com as pinças para retirada do tecido conectivo e adiposo e, em seguida, foi dividida em 6 segmentos cilíndricos de 3 a 4 mm de comprimento (Figura 6). Durante todo este processo, a aorta e seus segmentos estiveram submersos em solução fria de Krebs- Henseleit.

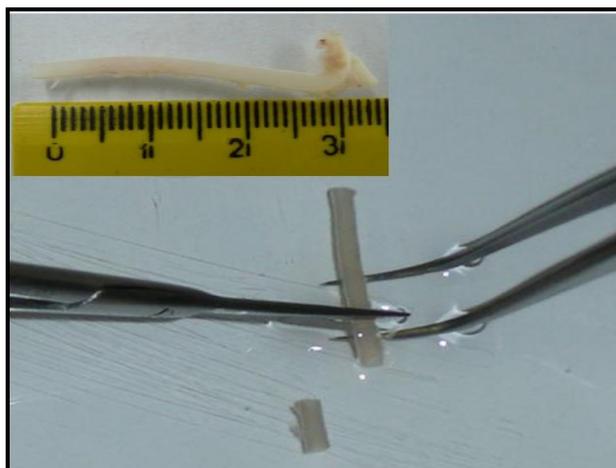


Figura 6 – Aorta torácica, de um rato Wistar, imersa em solução fria de Krebs-Henseleit, após a remoção do tecido conectivo e adiposo, sendo dividida em segmentos cilíndricos de 3 a 4 mm. (Adaptado de Angeli, 2013).

Após a manipulação, os segmentos foram adaptados ao aparato experimental, representado esquematicamente na Figura 7. Cada anel da artéria foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit continuamente gaseificada com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂), com o pH em torno de 7,4, e mantida aquecida a $36 \pm 0,5$ °C por um sistema de Banho Maria circulante com termostato.

Para a montagem da preparação, dois fios de aço inoxidável, delineados em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos anéis da aorta, de forma que esses fios permanecessem paralelos quando o anel fosse tensionado. Um dos triângulos foi colocado na haste fixa da preparação, presa no fundo da cuba, e o outro triângulo foi colocado na haste móvel, ligada ao transdutor de força isométrica (TSD 125 C 50g, *BIOPAC Systems, Inc.*, Califórnia, EUA). Assim, qualquer alteração no diâmetro do vaso era captada por este transdutor, que estava ligado ao sistema de aquisição de dados biológicos (*BIOPAC Systems, Inc.*, Califórnia, EUA) que, por sua vez, estava conectado ao computador (Figura 7).

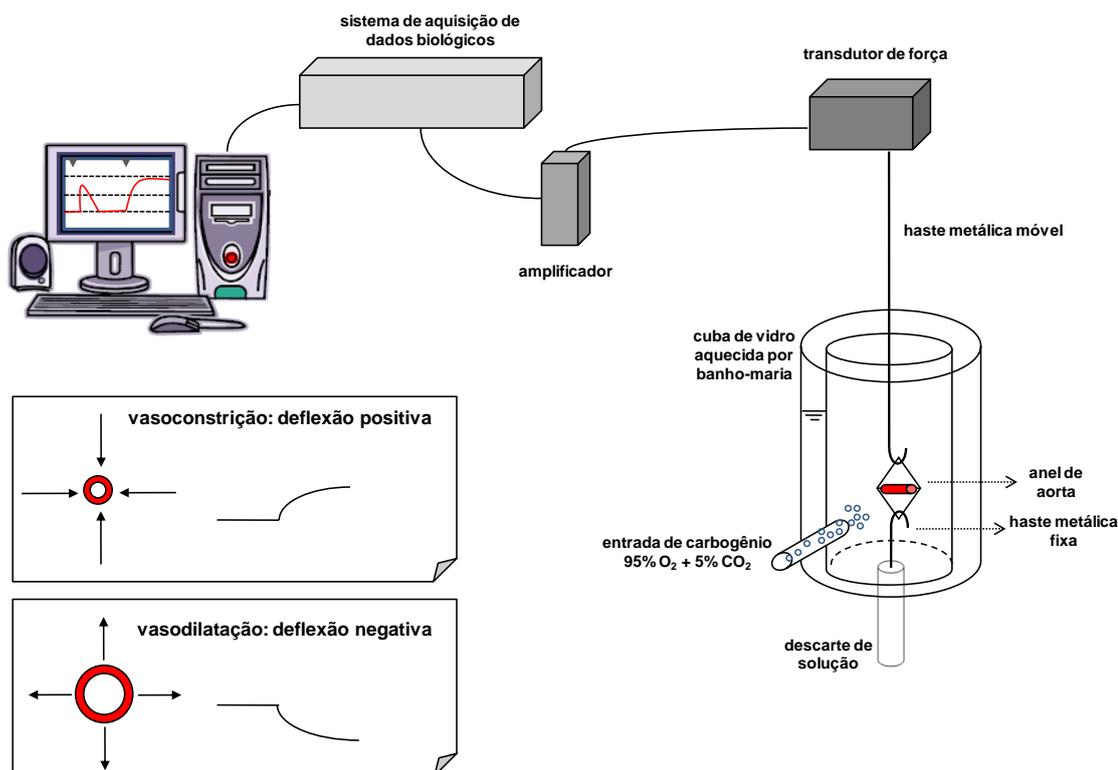


Figura 7 – Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de aorta em banho de órgãos para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro* (adaptado de Faria, 2014).

O anel de aorta é adaptado à preparação através de dois triângulos de aço inoxidável, fixos superior e inferiormente por uma haste móvel e outra fixa, respectivamente. O transdutor de força detecta variações mecânicas na resposta vascular, as quais são traduzidas pelo sistema de aquisição de dados biológicos e transferidas ao computador para registro.

Após a montagem, os anéis de aorta foram mantidos a uma força de repouso de 1,5 grama-força durante 45 minutos de estabilização. Grama-força é uma unidade de medida definida como sendo a força exercida por uma massa de um grama sujeita a certa gravidade, e é equivalente a grama, a qual será adotada neste estudo para representar a força gerada pelo anel de aorta. O equivalente no Sistema Internacional (SI) para a força basal do anel em repouso é de 0,015 N.

3.5.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Após o período de estabilização (Figura 8 A), foi adicionado cloreto de potássio (KCl) ao banho (concentração final de 75 mM) para estimular a atividade contrátil induzida por despolarização (Figura 8 B). Após contração, os anéis eram lavados (Figura 8 C) aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornarem a tensão de repouso, seguido de 30 minutos de estabilização (Figura 8 D). Em seguida, uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho (Figura 8 E) para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular (Figura 8 F), aferida após 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração. Quando era obtida uma variação de, pelo menos, um grama de força a partir do valor basal, os anéis de aorta dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 eram considerados íntegros. Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes (Figura 8 G) para que retornassem à tensão de repouso e, depois de 30 minutos estabilizando (Figura 8 H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.5.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A viabilidade endotelial foi avaliada por meio de uma contração com 1 μ M de fenilefrina (Figura 8 I e Figura 8 J), seguida da indução do relaxamento produzido através da adição de 10 μ M de acetilcolina (Figura 8 K). A integridade funcional do endotélio foi considerada apenas nos anéis em que a ACh foi capaz de induzir relaxamento: a) igual ou superior a 85 % nos ratos Wistar controles; ou b) igual ou superior que 70 % nos ratos dos grupos SHR, ambos em relação à contração máxima provocada pela fenilefrina.

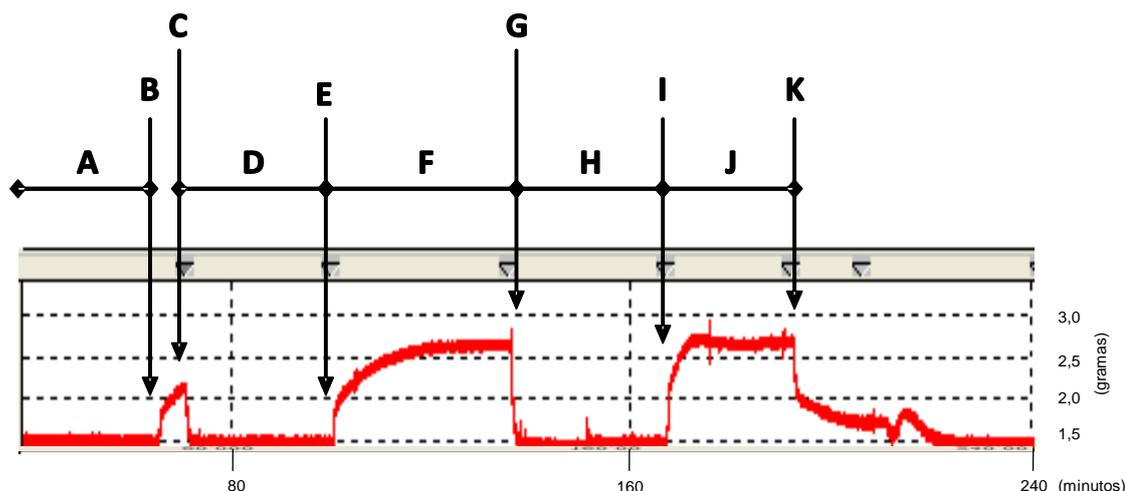


Figura 8 – Registro com curvas representativas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. Teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl:

A) Período de estabilização inicial (45 min com força basal de 1,5 gramas); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Contração com fenilefrina 1 μ M; J) Contração induzida pela fenilefrina; K) Adição de acetilcolina 10 μ M. O tempo foi registrado em minutos, representado no eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força registrada em gramas (g), observada no eixo vertical. (adaptado de Dias, 2011).

3.5.3 Avaliação do tratamento com anti-TLR4 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade muscular lisa e endotelial, os diferentes anéis de aorta seguiram protocolos diferentes, embora muitos deles fossem simultâneos. Neste caso, os anéis foram lavados três vezes e passaram por um período de estabilização de 30 minutos, mantendo a tensão basal. Para investigar o efeito do tratamento com anticorpo anti-TLR4 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, agonista alfa-adrenérgico, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina, na concentração de 0,1 nM a 0,3 mM, totalizando 14 distintas concentrações adicionadas ao banho, em ordem crescente (Figura 9 A). O efeito frente a esta concentração crescente de fenilefrina foi normalizado em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (75 mM), que foi considerada 100 % da resposta contrátil.

3.5.4 Avaliação da inibição do TLR4 sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Para estudar o efeito do tratamento com anti-TLR4 sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (0,01 nM a 0,3 mM) - totalizando 16 distintas concentrações adicionadas ao banho, em ordem crescente - em anéis de aorta previamente contraídos com fenilefrina (1 μ M). A curva de acetilcolina era iniciada assim que a pré-contração com fenilefrina atingisse um platô de contração (Figura 9 B). O efeito vasodilatador frente à acetilcolina foi calculado como percentual de relaxamento considerando o platô de contração à fenilefrina, sendo este platô considerado 100 % da contração.

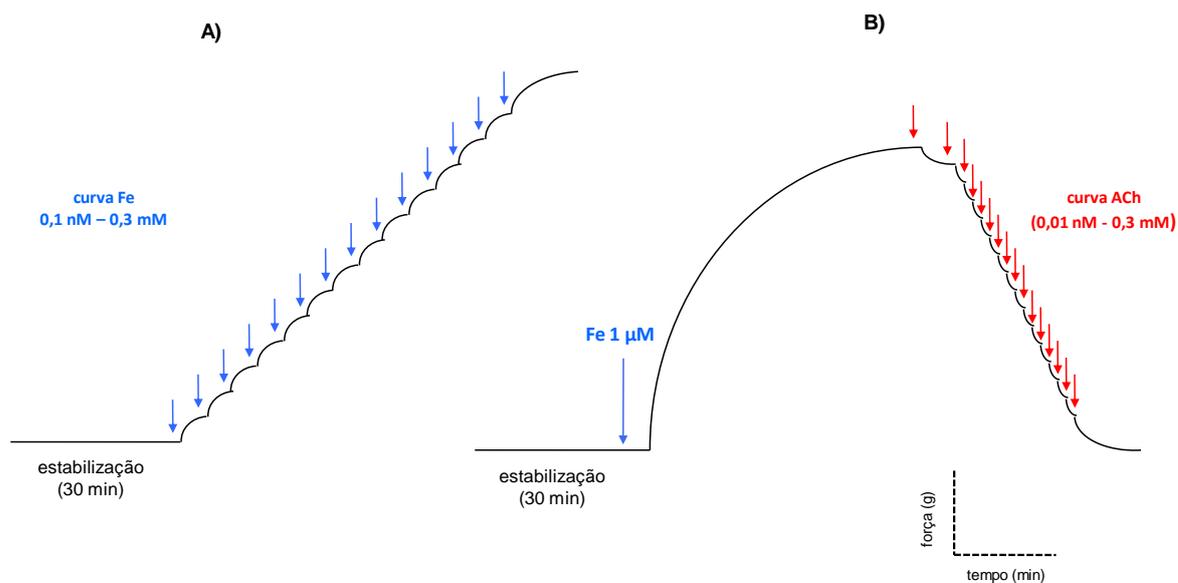


Figura 9 – Esquema representativo das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe), em que pode ser observada a vasoconstrição do anel de aorta (A); e à acetilcolina (ACh), na qual é possível observar a vasodilatação dependente do endotélio (B).

Esses protocolos foram desenvolvidos em anéis de aorta de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4.

3.5.5 Estudo da modulação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

O efeito do tratamento com anti-TLR4 na participação do endotélio sobre a resposta à fenilefrina foi investigado após a remoção mecânica deste componente vascular, realizada antes da adaptação dos anéis de aorta ao aparato experimental. A retirada mecânica do endotélio foi realizada através de fricção suave na parede interna do anel de aorta utilizando um fio polido e rígido de aço inoxidável. A ausência do endotélio foi confirmada através da incapacidade de relaxamento dos anéis de aorta diante de 10 μM de acetilcolina após contração prévia com fenilefrina a 1 μM . Consideramos a incapacidade de relaxamento quando inferior a 10 %, calculada em relação ao máximo de contração à fenilefrina, como já descrito.

Sendo assim, curvas concentração-resposta à fenilefrina foram realizadas em anéis de aorta com endotélio íntegro (E^+) e sem endotélio (E^-), nos três grupos experimentais que participaram dos estudos de reatividade vascular: Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4.

3.5.6 Avaliação da liberação basal de óxido nítrico

Para investigar se a inibição do TLR4 influencia a liberação basal de óxido nítrico, foi desenvolvido o protocolo experimental descrito a seguir, baseado na publicação de Xavier e colaboradores (2003).

Depois da confirmação da integridade do músculo liso vascular e do endotélio, os anéis de aorta foram pré-contraídos com 1 μM de fenilefrina durante 30 minutos. Ao final deste período, foi adicionado um inibidor não seletivo para a síntese de óxido nítrico, o N^G -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), na concentração final no banho de 100 μM , durante 45 minutos.

Os resultados do tônus vascular adicional causado por L-NAME foram expressados como porcentagem da contração prévia causada pela fenilefrina (1 μM), como demonstrado na Figura 10.

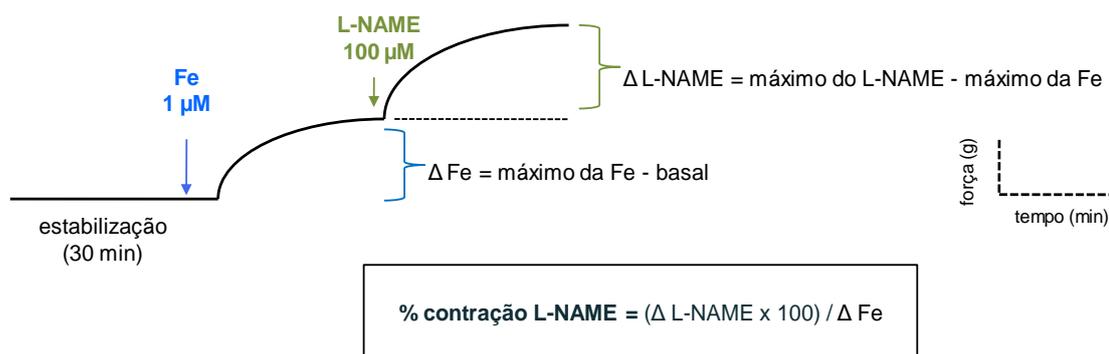


Figura 10 – Esquema do protocolo para avaliação da liberação basal de óxido nítrico em anéis de aorta de ratos, demonstrando o cálculo para obter a porcentagem de contração do L-NAME em relação à contração prévia com fenilefrina (Fe).

Esses protocolos foram feitos em anéis de aorta dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4.

3.5.7 Análise da participação das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina

Tem sido relatado que o aumento da produção de EROs contribui para a disfunção endotelial na hipertensão arterial (LASSÈGUE, SAN MARTÍN & GRINDLING, 2012; DINH *et al.*, 2014; BARADARAN, NASRI & RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Sendo assim, foram realizados experimentos de reatividade vascular *in vitro* para investigar o efeito do tratamento do anti-TLR4 sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina na presença de antioxidantes, possibilitando avaliar se o tratamento melhora a disfunção endotelial através da modulação da produção de ROS.

Para isso, experimentos paralelos em diferentes segmentos da aorta de um mesmo animal foram desenvolvidos na ausência (controle) e na presença de: varredor de ânion superóxido, ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno-dissulfônico (tiron, 1 µM); inibidor da NADPH oxidase, apocinina (30 µM); ou varredor de peróxido de hidrogênio, catalase (1000 U/mL), os quais foram colocados no banho 30 minutos antes da realização das curvas com fenilefrina, conforme esquematizado na Figura 11 A.

3.5.8 Análise da participação das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina

Do mesmo modo, os três grupos experimentais submetidos aos estudos de reatividade vascular (Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4) também participaram dos protocolos feitos para estudar o efeito da inibição do TLR4 na participação das espécies reativas ao oxigênio sobre a resposta vasodilatadora à acetilcolina.

Assim, protocolos experimentais nos diferentes anéis de aorta de um mesmo rato foram feitos na ausência (controle) e na presença de tiron ($1 \mu\text{M}$), apocinina ($30 \mu\text{M}$), ou catalase (1000 U/mL), os quais foram colocados no banho 30 minutos antes da realização da curva concentração-resposta à acetilcolina, conforme esquematizado na Figura 11 B.

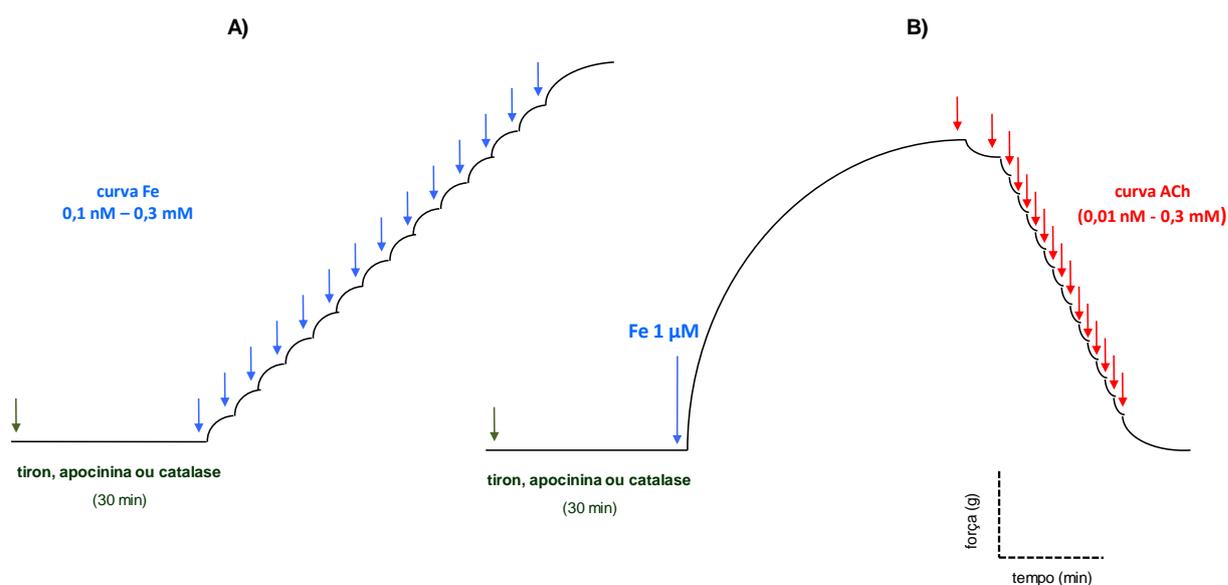


Figura 11 – Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe) (A) e à acetilcolina (ACh) (B), após a incubação por 30 minutos com tiron ($1 \mu\text{M}$), apocinina ($30 \mu\text{M}$), ou catalase (1000 U/mL).

Esses protocolos foram desenvolvidos em anéis de aorta de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4.

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Serão retomadas as descrições dos protocolos experimentais citados anteriormente, neste caso, realizados nos animais dos grupos Wistar controle e SHR controle.

Os animais foram eutanaziados por CO₂ e, em seguida, foi realizada toracotomia para a retirada da aorta torácica, imediatamente colocada em solução fria (4°C) de Krebs-Henseleit, para limpeza do tecido conectivo, adiposo e sanguíneo, cuidadosamente. Segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 mm de comprimento foram obtidos através de cortes transversais da aorta para a realização de imunofluorescência (ALVAREZ *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013), com a finalidade de identificar comparativamente o receptor TLR4 na parede vascular de ratos hipertensos e normotensos.

Para realização deste protocolo experimental, os segmentos de aorta foram fixados durante uma hora com paraformaldeído (PFA) 4 %, pH de 7,6. Depois, foram realizadas três lavagens consecutivas de 10 minutos cada com solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) 0,1 M e, em seguida, os segmentos arteriais foram colocados em uma solução de 0,1 M de PBS contendo 30 % de sacarose durante, pelo menos, duas horas, até que a artéria deixasse de flutuar e ficasse no fundo do recipiente, no caso, um tubo de eppendorf. Todas as etapas foram realizadas a 4 °C. Os seguimentos, então, foram adequadamente posicionados dentro de um *blister*, onde foram submergidos em meio de congelamento de tecidos para criostomia *Optimum cutting temperature* (OCT) *Tissue-Tek* (*Sakura, Finetek Europe, Flemingweg, Holanda*) até que este meio penetrasse uniformemente dentro da artéria, com muito cuidado para evitar a formação de bolhas. Então, as amostras eram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C até o dia de realizar o experimento.

Utilizando-se um criostato, foram feitos cortes transversais de 14 µm de largura nos segmentos da aorta, que por sua vez foram montados em lâminas gelatinadas. Depois de um período de 60-90 minutos a 37 °C, as seções transversais da aorta, obtidas com criostato, foram bloqueadas com PBS, 5 % de albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA) e 0,3 % de detergente polioxietileno sorbitano 20 (Tween 20) durante 2 h. O PBS foi usado para lavar, o

BSA para evitar uniões inespecíficas do anticorpo e o Tween 20 para evitar que os segmentos de aorta se soltem, e para permeabilizar o tecido, permitindo a entrada do anticorpo aos locais específicos.

Após bloqueio, as lâminas foram secas com a finalidade de evitar a diluição do anticorpo primário e, assim, as seções das artérias foram incubadas com anticorpo policlonal anti-TLR4 (1:100) diluído em PBS contendo 2 % BSA, por uma hora, a 37 °C, em câmara úmida. Dando continuidade, foram realizadas quatro lavagens, sendo a primeira rápida, seguida de outras três lavagens de 10 minutos cada, com PBS e Tween, sendo feita a secagem dos seguimentos ao final das lavagens. Posteriormente, as seções transversais da aorta foram incubadas com anticorpo secundário IgG anti-cabra conjugado ao marcador Alexa Fluor-546 (1:200) durante uma hora a 37 °C, em uma câmara úmida. Ao final, quatro lavagens foram realizadas de mesmo modo, bem como a secagem dos segmentos da artéria.

Os sinais de fluorescência foram visualizados utilizando-se um microscópio confocal invertido Leica TCS SP2 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*), com lente objetiva de imersão de 40X.

O componente fluorescente do anticorpo marcado com Alexa Fluor foi visualizado por excitação a $\lambda=546$ nm e por detecção entre $\lambda=550-650$ nm de comprimento de onda. A cor vermelha nas fotos captadas permite a visualização do receptor TLR4. Através da excitação e detecção nas mesmas faixas de comprimento de onda, a autofluorescência dos componentes elásticos da parede arterial pôde ser visualizada, na cor verde.

A especificidade do sinal foi avaliada através da omissão do anticorpo primário, conforme processamento descrito anteriormente. Nestas condições não foram observadas nenhuma coloração na parede vascular.

Os núcleos, por sua vez, foram tingidos com 0,01 mg de 4',6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato (DAPI) e visualizados com comprimento de onda de excitação de $\lambda=358$ nm e de emissão $\lambda=461$ nm. A cor azul nas fotos captadas permite a visualização dos núcleos.

3.7 CULTURA DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE AORTA

A obtenção de células para cultura primária de CMLVs foi realizada pelo método de explante, conforme descrito por Martín e colaboradores (2012), utilizando-se aortas de ratos dos grupos Wistar controle e SHR controle. Cada cultivo celular procedeu de aortas de aproximadamente três ratos, visando minimizar a variabilidade que existe entre os animais.

3.7.1 Obtenção das células de músculo liso vascular

Após eutanásia dos animais com CO₂, o tórax foi exposto e a aorta torácica foi removida, sendo colocada imediatamente em um tubo com meio de cultura frio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) contendo L-glutamina (1 g/L), piruvato (1 g/L), D-glicose (1g/L) e NaHCO₃ (0,08 %), para estabilizar o pH do meio. Este meio de cultura foi suplementado com 0,1 % de BSA e antibióticos, 200 U/mL de penicilina e 200 µg / mL de estreptomicina, com o objetivo de reduzir possíveis contaminações durante a manipulação.

A partir desse momento, todos os procedimentos foram realizados cuidadosamente dentro de uma capela de fluxo laminar NU-425-300 classe 2 (*NuAIRE, Plymouth, Minnesota, EUA*), localizada numa sala estéril específica para cultura celular, com a finalidade de preservar a máxima esterilidade. Para melhor manejo da aorta, esta foi colocada sobre uma placa de Petri cuja superfície foi coberta com silicone (*SYLGARD-Silicone elastomero, Dow Corning Corporation, Michigan, EUA*) e a artéria foi fixada pelos dois extremos com duas agulhas. Assim, com auxílio de pinças de dissecação, foram delicadamente eliminados os tecidos perivasculares conectivo e adiposo da aorta.

Para viabilizar a remoção mecânica da camada adventícia, a aorta foi colocada em outra placa estéril, com novo meio de cultura descrito acima, mas contendo também colagenase tipo II (2 mg / mL). A placa foi então colocada na incubadora NU Autoflow 4750 (*NuAIRE, Plymouth, Minnesota, EUA*) a 37°C, em atmosfera umidificada com 95 % de ar comprimido e 5 % de CO₂, durante 30 minutos. Após esse período, a camada adventícia vascular foi cuidadosamente removida com o auxílio das pinças.

Após remoção da camada adventícia, a aorta era cortada em diversos pequenos fragmentos de 2 a 3 milímetros, os quais foram colocados em placas de 6 poços com 2 cm² de superfície cada (*6-well Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*), contendo 2 mL de meio de cultura DMEM suplementado a 10 % com soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum, FBS*), e antibióticos, penicilina e estreptomicina (P-S).

As placas, então, permaneciam na incubadora a 37 °C, em atmosfera umidificada com 95 % de ar comprimido e 5 % de CO₂, durante toda a cultura celular. Diariamente, os fragmentos das aortas eram observados sob uma lupa Leica 6SD (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*) localizada na sala de cultura celular e, conforme necessidade, mais meio de cultura era adicionado à placa a cada 48 - 72 horas.

3.7.2 Crescimento das culturas primárias de células de músculo liso

Passados cerca de sete a dez dias, foi comprovada a aparição de CMLVs procedentes dos explantes teciduais, as quais se aderiam ao fundo da placa em que estavam e, assim, cresciam e multiplicavam-se.

Quando as células atingiam confluência aproximada de 50 %, os fragmentos de aorta eram retirados das placas e nos próximos 2-3 dias seguintes as CMLVs permaneciam em crescimento, em meio de cultura DMEM suplementado com FBS e P-S. Uma vez alcançada a confluência de 70 %, o que ocorreu aproximadamente duas semanas após a extração da aorta, as células foram desprendidas das placas, sendo levadas ao Passe 1. Para isso, as células eram lavadas 3 vezes com PBS sem cálcio (Ca²⁺) e sem magnésio (Mg²⁺), mantendo a terceira lavagem por 10 minutos, aproximadamente, dentro da incubadora a 37 °C. O PBS sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺ favorece a separação das células da placa e de uma das outras, pois esses cátions são essenciais à atividade das integrinas, proteínas que promovem a adesão celular. À continuação, foi retirado o PBS das placas e foi adicionado tripsina-EDTA a 0,05 % durante 1 minuto na incubadora a 37 °C, com o objetivo de facilitar a suspensão das células do fundo das placas. A tripsina é uma protease que digere proteínas de adesão, como as que aderem as células à placa. Por sua vez, o EDTA é um quelante dos cátions, impedindo-os de agir como co-fatores da atividade das proteínas de adesão. Em seguida, a tripsina foi neutralizada por meio DMEM com

FBS a 10 % e as células foram semeadas em frascos de 25 cm² (*T-25 Cell Culture Flask, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*), para aumentar a quantidade de células e os números de passes.

Cada tripsinização / passe foi realizada com uma frequência média entre 4 e 7 dias. Os experimentos foram desenvolvidos em células provenientes dos passes compreendidos entre o número 2 a 5.

3.7.3 Caracterização das células de músculo liso vascular

A caracterização das células como CMLV, conforme anteriormente descrito (MARTÍN *et al.*, 2012), considerou suas características morfológicas e de crescimento.

As CMLVs em cultura foram estudadas morfológicamente mediante microscopia ótica de contraste de fase (*Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemanha*). Durante seu crescimento, as células formaram monocamadas que se sobrepunham, originando uma estrutura morfológica típica do músculo liso cultivado, chamada estrutura de “colinas e vales” (*hills and valleys*). As células mantiveram a morfologia de músculo liso ao longo do seu crescimento em todos os subcultivos utilizados para os diferentes experimentos.

O fenótipo das CMLVs em cultivo foi determinado mediante técnicas de imunohistoquímica, determinando-se a presença de α -actina, por ser a primeira proteína que se expressa nas células de músculo liso. Para isso, as células foram incubadas com anticorpo primário anti- α -actina monoclonal específico, procedente de camundongo (1: 200), seguido de incubação com o anticorpo secundário fluorescente anti-camundongo FITC (isotiocianato de fluoresceína) diluído 1:10. A visualização ocorreu com os seguintes comprimentos de onda: 194 nm (excitação) e 518 nm (detecção), possibilitando a visualização das fibras de α -actina, em verde.

A fluorescência foi vista através de um microscópio confocal Leica TCS SP2 (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*), com lente objetiva de imersão de 63X (zoom 2X), conforme fotografia a seguir (Figura 12).

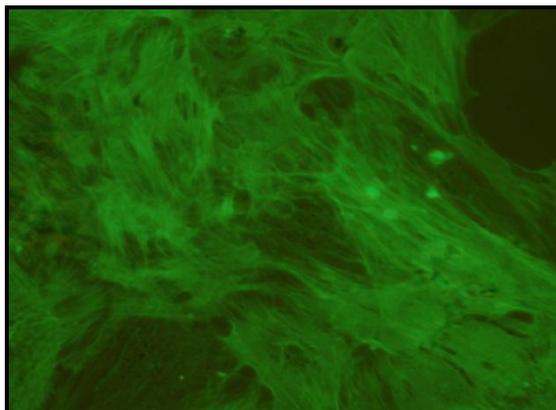


Figura 12 – Fotografia de células de músculo liso vascular em que se podem observar as fibras de α -actina, em verde. Imagem obtida com microscópio confocal Leica TCS SP2, com lente objetiva de 63X (zoom 2X).

3.7.4 Protocolos experimentais em células de músculo liso vascular

Um dia antes do experimento, as células passavam por um jejum, feito com a troca do meio DMEM a 10 % de FBS para um novo meio de cultura DMEM livre de FBS, suplementado com BSA a 0,1 %, além dos antibióticos P-S, 24 horas antes do início dos protocolos experimentais.

Na primeira sequência de experimentos, as CMLV não receberam estímulos ou inibidores ao final do jejum, sendo somente lavadas três vezes com PBS frio sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} e, então, foram desenvolvidos os protocolos para extração e quantificação de RNAm. Dessas células, tanto de ratos Wistar controle quanto de SHRs controles, foram quantificadas a expressão de RNAm do receptor TLR4 através de qRT-PCR com a finalidade de investigar se este receptor está aumentado em ratos hipertensos, quando comparado aos normotensos.

Em outra sequência de experimentos utilizando as CMLVs de SHRs controles, ao final das 24 horas de jejum, as células foram estimuladas com 100 nM de angiotensina II em diferentes tempos (*time course*): 15 minutos, 30 minutos, duas horas ou três horas, para posterior realização de qRT-PCR com objetivo de quantificar RNAm de TLR4, buscando avaliar se a angiotensina II promove aumento da expressão desse receptor e, com o *time course*, investigar em qual tempo ocorre essa possível sensibilização. Além disso, CMLVs de SHR estimuladas por duas horas com angiotensina II (100 nM) foram previamente incubadas com losartan (1 μM) por uma hora, as quais também tiveram RNAm de TLR4 quantificado. Esse

protocolo foi desenvolvido com a finalidade de investigar se a inibição da angiotensina II, através do bloqueio do receptor AT_1 , é capaz de reduzir o possível aumento do receptor do TLR4 em ratos hipertensos. Ao final das respectivas inibição / estimulação, as CMLVs eram lavadas três vezes com PBS frio sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} , do mesmo modo descrito para a sequência anterior.

Em relação aos demais experimentos com células cultivadas, CMLVs de SHRs controles, após jejum de 24 horas, foram estimuladas por angiotensina II (100 nM) durante duas horas, com ou sem incubação prévia por 1 hora com o inibidor de TLR4 denominado CLI-095 (1 μ M) (LI *et al.*, 2006; KAWAMOTO *et al.*, 2008), conforme esquematizado na Figura 13. Ao final das duas horas de estímulo com angiotensina II, as CMLVs dos SHRs eram lavadas com PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} e, então, direcionadas para os diferentes experimentos de acordo com os respectivos protocolos a serem desenvolvidos com estas células.

A quantificação da migração e da proliferação celular, excetuando-se da descrição acima, foi feita com CMLVs estimuladas com CLI-095 (1 μ M) por uma hora seguida de 24 horas de estímulo com angiotensina II (100 nM), para que houvesse tempo hábil para a ocorrência dos fenômenos estudados.

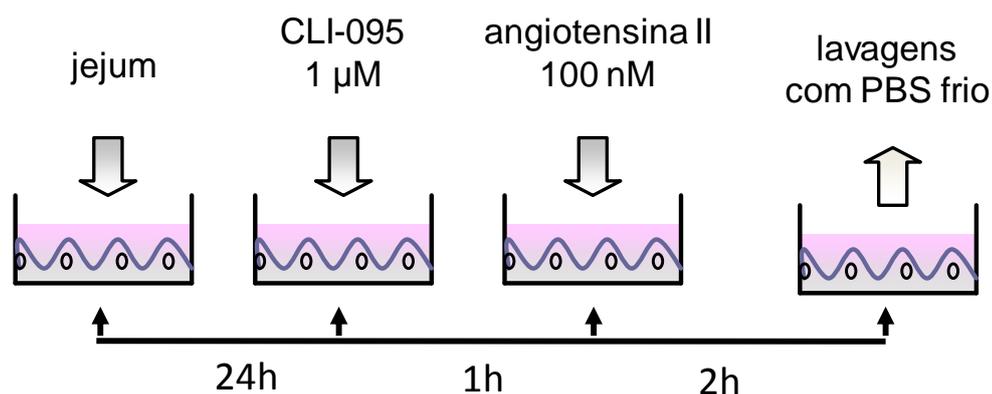


Figura 13 – Esquema representativo do protocolo experimental utilizado ao final da cultura de células de músculo liso de aorta de ratos SHR controle.

Após 24 horas de jejum (meio de cultura DMEM livre de FBS e suplementado com BSA 0,1 % e antibióticos), as células foram estimuladas por angiotensina II (100 nM) durante duas horas, com ou sem incubação prévia por 1 hora com o inibidor de TLR4, CLI-095 (1 μ M).

A especificidade do CLI-095 foi determinada através da capacidade de abolir a indução da expressão proteica de COX-2 em CMLVs diante da exposição ao LPS (dados não demonstrados), que é o ligante característico do TLR4.

Sendo assim, diversos experimentos foram realizados com a finalidade de investigar a participação do TLR4 sobre as ações da angiotensina II em células de músculo liso de aortas de ratos hipertensos. Tais experimentos serão descritos em seguida, sendo eles: quantificação de RNAm de NOX-1, NOX-2, NOX-4, p22phox e COX-2 por qRT-PCR; atividade da NADPH oxidase; produção de ânion superóxido; quantificação de proteínas por técnica de Western Blot; migração celular e proliferação celular.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE RNA MENSAGEIRO

Os níveis de RNAm foram determinados por RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) em tempo real (qRT-PCR) pelo método descrito por Chomczynski & Sacchi (1987) com algumas adaptações.

A quantificação da expressão de RNAm do receptor TLR4 foi obtida a partir de CMLVs de ratos Wistar e SHRs controles e segmentos de aorta torácica desses mesmos grupos, além do grupo SHR losartan, o qual recebeu tratamento com losartan (15 mg/Kg . dia), na água de beber, durante 12 semanas. O tratamento com losartan nos SHRs permitiu analisar se o aumento do TLR4 dos segmentos de aorta de animais hipertensos tem influência da angiotensina II, mais especificamente, através da ação de seu receptor AT₁.

Foi também quantificado os níveis de RNAm de TLR4 em CMLVs de SHRs controles estimuladas com angiotensina II (100 nM) por 15 minutos, 30 minutos, duas horas ou três horas, conforme *time course* já mencionado, além de CMLVs de SHR estimuladas por duas horas com angiotensina II (100 nM) e previamente incubadas com losartan (1 µM) por uma hora.

Níveis de RNAm de NOX-1, NOX-2, NOX-4, p22phox e COX-2 foram também obtidos a partir de CMLVs de ratos SHRs controles estimuladas com angiotensina II (100 nM, 2 horas) e na presença ou ausência de CLI-095 (1 µM, 1 hora). A quantificação de RNAm de subunidades da NADPH oxidase (NOX-1, NOX-2, NOX-4 e p22phox), bem como de COX-2, foi realizada com o objetivo de investigar se o incremento dos níveis desses RNAm causado pela angiotensina II em CMLVs de SHRs pode ser reduzido pela inibição do TLR4, permitindo verificar se o TLR4 participa de efeitos mediados pela angiotensina II na hipertensão.

Com a finalidade de extrair o RNA das CMLVs cultivadas, depois de finalizados os diferentes estímulos / inibições aos que se submeteram, foi retirado o meio de cultura contendo os fármacos e / ou inibidores das placas, sendo, em seguida, realizadas três lavagens com PBS frio sem Ca²⁺ e sem Mg²⁺. À continuidade da manipulação das placas, sobre uma caixa contendo gelo triturado, o PBS foi totalmente eliminado e 1 mL de *TRI-Reagent* foi adicionado aos poços das placas, pipetando-o para cima e para baixo continuamente, para a lise e suspensão das células. O *TRI-Reagent*, solução específica para a extração e preservação do

RNA total, produz a ruptura das células ao dissolver lipídios e precipitar proteínas, preservando a integridade do RNA.

Para a extração do RNA dos segmentos de aorta, as artérias foram homogeneizadas durante 10 minutos, com 800 μL de *TRI-Reagent* utilizando-se um homogeneizador mecânico, o Politrón (*PT-2010, Kinematica AG, Lucerna, Suíça*), a 10.000 xg, sendo “g” ou “xg” a representação de uma medida de aceleração (aceleração gravitacional da Terra), usada para determinar a força centrífuga relativa determinada pela rotação do equipamento. Em seguida, os sobrenadantes foram retirados, aos quais foram adicionados 200 μL de clorofórmio. Esta mistura permaneceu em temperatura ambiente durante 5 minutos e então foi centrifugada a 12.000 xg, durante 15 minutos, a 4 °C. A adição do clorofórmio junto à centrifugação permite a separação das duas fases, uma orgânica e outra aquosa, na qual permanece o RNA.

Para precipitar o RNA total foram adicionados 500 μL de isopropanol e 10 μg de glicogênio, cuja função é formar complexos com os ácidos nucleicos que permitam a formação de precipitados visíveis e facilmente manipuláveis. Essa mistura permaneceu 30 minutos a temperatura ambiente e foi posteriormente centrifugada a 12.000 xg, durante 30 minutos, a 4 °C. Os precipitados foram lavados com 800 μL de etanol preparado a 75 % em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e foram centrifugados a 4 °C a 7.500 xg para os homogenados arteriais e a 10.000 para os lisados celulares, favorecendo, assim, a adesão de precipitados ao fundo do tubo evitando que se desintegrem-se. Dando continuidade, o etanol foi retirado e os precipitados foram secando ao ar ambiente, para assegurar a completa eliminação do álcool, por se tratar de um potente inibidor das reações enzimáticas que se submetem as amostras nos processos seguintes. Os precipitados foram ressuspensos em 10-15 μL de água DEPC filtrada e a quantificação do RNA total extraído foi calculado medindo-se a absorvância a um comprimento de onda de 260 nm em um espectrofotômetro (*Eppendorf Biophotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha*). Finalmente, as amostras eram armazenadas a -80 °C até que seja realizada a retrotranscrição.

Para evitar possíveis contaminações com DNA genômico, 1 μg de RNAm total foi tratado com DNase. O RNA foi, então, retrotranscrito a DNA complementar (DNAc) usando um kit comercial (*High-Capacity cDNA Archive Kit, Applied*

Biosystems, Califórnia, EUA), sendo o protocolo desenvolvido de acordo com as instruções comerciais em 20 µL de volume de reação. A mistura foi processada em um termociclador (*Marterclycler Gradient, Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha), durante dez minutos a 25 °C e a duas horas a 37 °C. Ao final, foi adicionado mais um passo, a 70 °C durante 5 minutos para inativar a retrotranscriptase. Finalizada a retrotranscrição, e assumida eficácia de 100 % na conversão de RNA total em DNAC, os DNAC obtidos se mantiveram a -20 °C até sua utilização posterior.

A PCR em tempo real foi desenvolvida utilizando o sistema ABI *Prism 7000 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA) mediante corante fluorescente *SyBR Green Supermix with ROX* ou usando *Taqman Universal PCR Mastermix*.

Foram realizadas curvas de concentração para determinar a quantidade de DNAC necessário de cada gene, a qual foi adicionado a uma mistura com a sonda descrita acima e o primer específico para amplificar o gene de interesse, sendo eles: TLR4 (primer direto: TGTGCCTTCAAACATGACTGG e primer reverso: CTCCAAGATCAACCGATGG); NOX-2 (primer direto: CCAGTGAAGATGTGTTTCAGCT e primer reverso: GCACAGCCAGTAGAAGTAGAT); p22phox (primer direto: GGACAGAAGTACCTGACCGC e primer reverso: GATGGTGGCCAGCAGGAAG); NOX- 1 (Rn00586652_m1); NOX-4 (Rn00585380_m1); e COX-2 (Rn00568225_m1), sendo os três primeiros *SyBR Green* (*Bio-Rad Laboratories*, California, EUA) e os demais *Taqman Gene Expression Assays* (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA).

Os resultados da amplificação foram normalizados em relação aos dados obtidos da amplificação de genes cuja expressão é constante, independente da situação experimental dos tratamentos. Como controle endógeno foi utilizado o gene da β₂-microglobulina (Rn00560865_m1) ou Ciclofilina D (Rn01458749_g1) (*Taqman Gene Expression Assays, Applied Biosystems*, Califórnia, EUA).

O programa de amplificação usado foi: 1^o) incubação inicial a 50 °C, por dois minutos; 2^o) desnaturalização inicial a 95 °C, por dez minutos; e 3^o) 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por um minuto.

Para calcular o índice relativo da expressão gênica, foi empregado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ usando amostras não tratadas para calibração.

3.9 ATIVIDADE DA NADPH OXIDASE

A geração de ânion superóxido através da atividade da NADPH oxidase foi mensurada com a finalidade de investigar se o receptor TLR4 participa do aumento da atividade dessa enzima causado pela angiotensina II em células de ratos hipertensos.

A atividade da NADPH oxidase vascular foi determinada através da quimioluminescência emitida pela reação entre lucigenina e ânion superóxido, de acordo com o protocolo descrito por San José e colaboradores (2009), com pequenas adaptações. A lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina) é um composto aromático que pode ser reduzido pelo ânion superóxido, produzindo emissão de luz, a qual pode ser detectada através de um luminômetro.

CMLVs foram cultivadas conforme descrito previamente e, então, foram estimuladas com 100 nM de angiotensina II por duas horas na presença ou ausência de 1 μ M de CLI-095, o qual foi adicionado uma hora antes da angiotensina II. Após as lavagens, as células foram suspensas e homogeneizadas em um solução para lise celular contendo 50 mM KH_2PO_4 , 1 mM ácido etileno glicol tetraacético (EGTA), 150 nM sacarose, em pH = 7,4.

A reação foi iniciada através da adição de uma mistura de 5 μ M de lucigenina e 100 μ M de NAD(P)H à amostra de proteína obtida das CMLVs, totalizando um volume final de 300 μ L. A quimioluminescência foi determinada em um luminômetro de placa (*Auto-Lumat LB 953, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Alemanha*) programado para registrar a quimioluminescência em unidades relativas de luz (URL) emitidas em intervalos de 2,4 segundos durante cinco minutos. A emissão específica de luz foi calculada após subtrair a leitura da atividade de fundo (branco), que foi determinada em tubos contendo todos os componentes, exceto o homogenato protéico, que foi substituído pela solução de lise celular em que estavam tratadas as amostras.

Foi utilizado o valor da área abaixo da curva para quantificar a quimioluminescência e os dados foram descritos com URL por miligrama de proteína (URL / mg proteína). Os dados obtidos (URL / mg proteína) foram expressados como incremento sobre a situação controle, assumida para o valor de 1 URL / mg proteína.

Para verificar a especificidade do ensaio de lucigenina pela produção de ânion superóxido, San José e colaboradores (2009) examinaram previamente o efeito do varredor enzimático de ânion superóxido, a enzima superóxido desmutase (SOD), a 100 U / mL, sendo observada a abolição da produção do ânion nestes experimentos.

3.10 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

O corante fluorescente oxidativo dihidroetídio (DHE) foi usado para avaliar *in situ* a produção de ânion superóxido em CML Vs de ratos SHR controles (MARTÍN *et al.*, 2012), com a finalidade de investigar se o TLR4 é capaz de influenciar o aumento de ânions superóxidos encontrados em células de SHRs estimuladas por angiotensina II.

As CML Vs de SHRs utilizadas foram cultivadas conforme descrição anterior, entretanto, quando foram para o último passe antes dos experimentos, após tripsinizadas, as células foram semeadas sobre dois pequenos cristais circulares, os quais eram colocados dentro de cada um dos seis poços das placas (Figura 14).

Foi dada continuidade à cultura das CML Vs sobre os pequenos cristais das placas de seis poços e, ao alcançarem 60 a 80 % de confluência, as células foram estimuladas com 100 nM de angiotensina II por duas horas na ausência ou presença prévia de 1 μ M de CLI-095 (por uma hora). Na sequência, as células foram lavadas e, então, incubadas com 10 μ M de DHE diluído em meio de cultura celular DMEM com 0,1 % de BSA durante 30 minutos, a 37 °C, na incubadora úmida.

A hidroetidina é capaz de atravessar livremente as membranas celulares e de oxidar-se na presença de ânions superóxidos, transformando-se em brometo de etídio, o qual fica retido no interior da célula através de sua capacidade de se intercalar com o DNA. O brometo de etídio é excitado a 546 nm e tem um comprimento de onda de emissão de 610 nm.

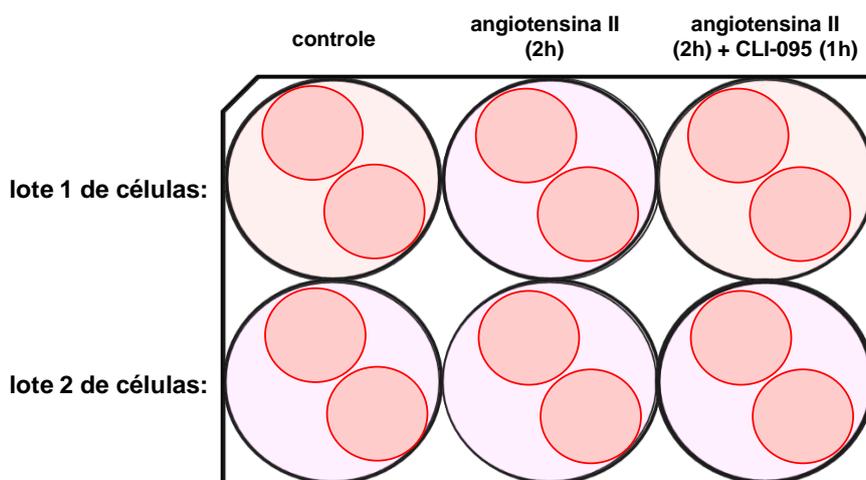


Figura 14 – Esquema representando a cultura de células de músculo liso de aorta sobre dois pequenos cristais, para posterior mensuração da produção de ânion superóxido pela técnica de dihidroetídeo (DHE).

No esquema podem ser observados os protocolos experimentais das diferentes situações: A) controle; B) angiotensina II; e C) angiotensina II + CLI-095, em dois distintos lotes de células utilizando-se a mesma placa de seis poços.

As imagens foram adquiridas utilizando-se um microscópio de fluorescência (*Nikon Eclipse T300*, objetiva x20, *Nikon Corporation*, Tóquio, Japão), e foram capturadas através de uma câmera *spot* digital (*Diagnostic, Spectra Services*, Nova Iorque, EUA).

Como situação controle, foram utilizadas CMLVs de SHRs sem estímulos ou tratamentos prévios, as quais tiveram suas imagens obtidas ao longo do estudo, em paralelo.

A intensidade da fluorescência foi quantificada de 10 a 15 núcleos / experimento e imagem, utilizando um software de análise de imagem denominado *Metamorph* (*Molecular Devices Corp.*, Pensilvânia, EUA).

Os efeitos das diferentes situações (angiotensina II e angiotensina II + CLI-095) foram expressados como incremento sobre a situação controle, sem estímulo ou tratamento, para a qual foi atribuído o valor de 1 (um) para a intensidade da fluorescência obtida.

3.11 EXPRESSÃO PROTEICA DA CICLOOXIGENASE-2

Este protocolo foi desenvolvido com o objetivo de analisar a participação do receptor TLR4 no aumento da expressão proteica da enzima COX-2 causado por angiotensina II em ratos hipertensos.

A expressão proteica foi determinada através da técnica de Western Blot (TOWBIN *et al.*, 1979), utilizando CMLVs de SHRs. Ao final da cultura celular, as células foram incubadas ou não com CLI 0-95 (1 μ M) durante uma hora, seguido de estímulo com angiotensina II durante duas horas, estabelecendo as seguintes condições experimentais: 1) controle; 2) angiotensina II (100 nM); 3) angiotensina II (100 nM) + CLI-095 (1 μ M); e 4) CLI-095 (1 μ M). O grupo controle não foi submetido à inibição do receptor TLR4 por CLI-095 ou ao estímulo da angiotensina II, para o qual foi atribuído o valor de 1 (um) para a expressão proteica de COX-2 quantificada. Para controle de carga, foi realizada nas mesmas amostras, paralelamente, a quantificação da expressão proteica da proteína β -actina.

As células foram lavadas com PBS frio sem Ca^{2+} e Mg^{2+} e, depois de removido todo o PBS, foram retiradas das placas com um pequenino rodo, juntamente a 100-150 μ L de uma solução denominada *Radioimmunoprecipitation Assay* (RIPA), composta por: 150 mM NaCl, 1 % de octilfenoxipolietoxietanol (um detergente não desnaturante, o IGEPAL[®] CA-630), 0,5 % de deoxicolato de sódio, 0,1 % de dodecilsulfato de sódio (SDS), e 50 mM de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), em pH=8,0. A solução RIPA é eficiente para a lise celular e para a solubilização da proteína, evitando que esta se degrade. À solução RIPA foi adicionado um coquetel inibidor de proteases e uma mistura de inibidores de fosfatases, contendo 1 mM de ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), 20 mM de β -glicerolfosfato (BGP) e 10 mM de fluoreto de sódio (NaF).

A concentração de proteína dos lisados celulares foi quantificada por calorimetria, utilizando o método de *Micro BCA Protein Assay Kit* (Pierce *Biotechnology*, Ilinóis, EUA). O volume da amostra necessário foi calculado em função da quantidade de proteína que se desejava colocar para análise, o qual foi misturado a um volume igual de solução de tampão de carga, o tampão Laemmli 5X [300mM Tris-HCl em pH = 6,8; 10 % dodecil sulfato sódico (SDS); 25 % β -

mercaptoetanol; 0,5 % azul de bromofenol; 50 % glicerol]. Esta mistura foi incubada a 95 °C durante um minuto para desnaturar as proteínas.

Em um sistema de eletroforese Mini-Protean 3 Cell (*BioRad Laboratories*, Califórnia, EUA), foram polimerizados géis de SDS-poliacrilamida, sendo o primeiro gel (separador) composto de 7,5 % de acrilamida; 4,6 % de Tris-HCl em pH = 8,8; 0,1 % de SDS; 0,038 % de persulfato amônico; 0,033 % de tetrametiletenodiamina (Temed); e 3,4 % de glicerol. O segundo gel (concentrador) era formado por 3 % de acrilamida; 1,49 % de Tris-HCl em pH = 6,8; 0,1 % de SDS; 0,98 % de persulfato amônico; e 0,053 % de Temed.

Para analisar a expressão proteica da COX-2 e da β -actina, 25 μ L de lisados celulares foram separados por eletroforese em um gel separador contendo 7,5 % de acrilamida. Os géis foram colocados em uma pequena cuba preenchida completamente de solução tampão de eletroforese (25 mM de Tris; 200 mM de glicina e 1 % de SDS), que é um eletrólito com alta capacidade de tamponamento, e as amostras foram colocadas no gel concentrador juntamente com um marcador de peso molecular de amplo espectro (6 a 180 kDa). As proteínas de interesse, COX-2 e β -actina possuem peso molecular entre 70-72 kDa, e 42 kDa, respectivamente. À continuação, foi desenvolvida a eletroforese aplicando uma voltagem constante de 80 a 100 mV, fazendo com que as amostras passassem pelo gel concentrador primeiro e pelo gel separador depois.

Uma vez separadas, as proteínas foram transferidas a membranas de difluoreto de polivinilo (*Immun-Blot PVDF Membrane for Western Blotting 0,2 μ m*, *BioRad Laboratories*, Califórnia, EUA) previamente ativadas com metanol. Para isso, o gel, a membrana e vários pedaços de papel Whatman (*GE Healthcare Life Sciences*, Uppsala, Suécia) foram colocados em um sistema “sanduíche” dentro de uma cuba para transferência (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*, *BioRad Laboratories*, Califórnia, EUA), imersos em uma solução de transferência (25 mM de Tris; 190 mM de glicina; 0,05 % de SDS; 20 % de metanol). A transferência ocorreu por toda a noite (*over night*), em uma corrente de 230 mA, com as cubas mantidas dentro de uma geladeira, a 4 °C.

Uma vez transferidas as proteínas, já no dia seguinte, as membranas foram deixadas durante uma a duas horas a temperatura ambiente em agitação contínua

em uma solução de bloqueio para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Esta solução de bloqueio continha 5 % de leite desnatado em pó e 5 % de BSA, dissolvida em solução de lavagem das membranas: 10 mM de Tris-HCl a pH = 7,5; 100 mM de NaCl; e 0,1 % Tween-20.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por toda a noite a 4 °C em agitação contínua com os seguintes anticorpos primários: 1) anticorpo policlonal de coelho anti-COX-2 (1:300) e anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina (1:5000); ambos diluídos em solução de lavagem com 5 % de leite desnatado em pó. Uma vez finalizada a incubação com os anticorpos primários, foram feitas três lavagens sucessivas de dez minutos cada para eliminar os restos do anticorpo primário que não se uniram.

À continuidade, as membranas foram incubadas durante uma hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com o correspondente anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete: anticorpo IgG anti-coelho (1:5000) ou anti-camundongo (1:5000).

Diante da finalização da incubação dos anticorpos secundários, as membranas foram novamente lavadas três vezes e os imunocomplexos foram detectados por quimioluminescência utilizando o sistema peroxidase de rabanete-luminol (*Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido*). Este sistema é baseado na geração enzimática de um éster de acridina que reage com o peróxido, em condições ligeiramente alcalinas, produzindo uma luz de emissão muito intensa e de larga duração. As membranas, então, foram expostas a autorradiografia (*Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA*), e os sinais do imunoblot foram quantificados usando um *software* para quantificação, denominado Image Quant TL 7.0 (*Image Analysis Software GE Healthcare, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido*).

Os dados de expressão proteica de COX-2 foram expressados como razão da expressão proteica da β -actina, usada como controle de carga.

3.12 MIGRAÇÃO CELULAR

Para verificar o papel do receptor TLR4 na migração celular induzida por angiotensina II, foi realizado, *in vitro*, o ensaio *Wound Healing* (cicatrização de ferida), adaptado de Van Der Meer e colaboradores (2010).

As CMLVs de SHRs foram cultivadas e, no último passe antes da realização dos experimentos, as células foram colocadas em uma placa de 24 poços (*24-well Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*) após tripsinização. Quando atingida a confluência aproximada de 90-100 %, o meio de cultura foi trocado pelo meio de jejum (DMEM livre de FBS, suplementado com BSA a 0,1 %, além dos antibióticos P-S, o qual permaneceu por 24h.

Então, uma fina ferida vertical foi feita em cada pequeno poço da placa *24-well* com uma ponta de pipeta P10 (estéril, com filtro) (Figura 15 A), e o meio de cultura foi trocado duas vezes (5 mL / poço) para lavar todos os restos de células remanescentes da área da ferida. Uma linha foi desenhada no centro de cada poço, perpendicular ao sentido da ferida (sentido horizontal), por fora da placa, sobre o maior diâmetro de cada poço (Figura 15 B). Essas linhas foram desenhadas para que o mesmo ponto da placa fosse visualizado ao microscópio na captura das imagens.

Uma imagem foi captada no tempo zero (Figura 15 C) no local exatamente acima de intersecção da linha desenhada e da ferida. Para isso foi utilizado um microscópio invertido (*Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemanha*) acoplado a uma câmera *spot* digital (*Diagnostic, Spectra Services, Nova Iorque, EUA*).

Na sequência, as células foram tratadas por uma hora com 1 μ M de CLI-095, seguido de 100 nM de angiotensina II durante 24 horas. Assim, outra imagem foi captada na mesma região de cada poço após as 24 horas. Alguns poços não recebiam a pré-incubação com CLI-095 com a finalidade de avaliar apenas o efeito da angiotensina sobre a migração de CMLVs. Na situação controle as células não recebiam tratamento com CLI-095 tampouco com angiotensina II, assumido o valor 1 (μ m) para esta condição. Sendo assim, as condições experimentais foram: 1) controle (Figura 15 D); 2) angiotensina II, 100 nM (Figura 15 E); 3) angiotensina II, 100 nM + CLI-095, 1 μ M (Figura 15 F).

O software Adobe Photoshop CS2 foi usado para determinar a área de fechamento da ferida comparado ao tempo zero de cada tratamento e em relação à situação controle, assumida como 1 (um).

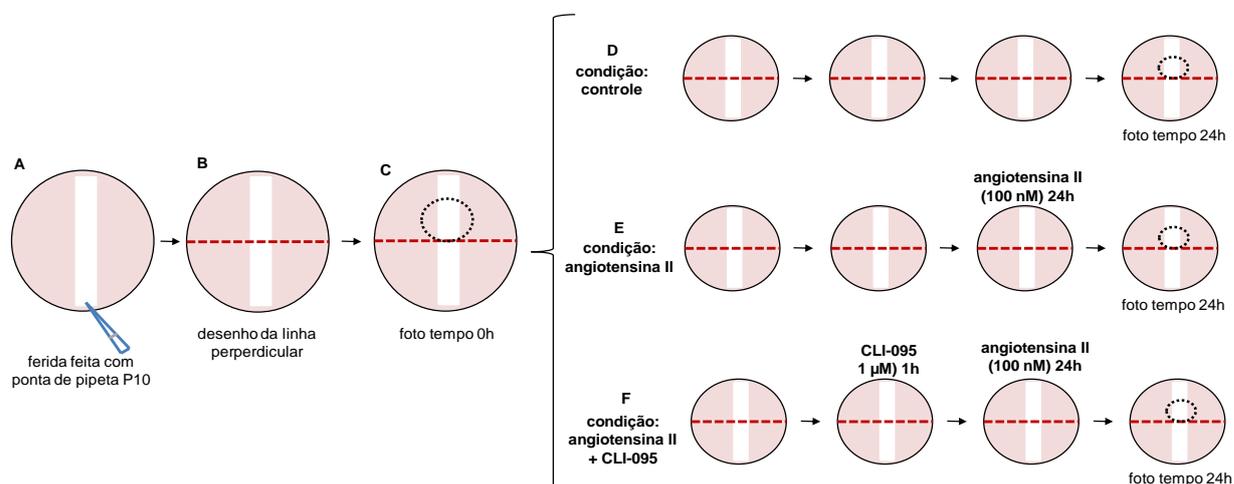


Figura 15 – Esquema do protocolo de migração celular (método *Wound Healing*):

A) ferida feita com ponta de pipeta P10; B) desenho, por fora da placa, da linha perpendicular à ferida; C) foto no tempo zero, antes dos estímulos; Diferentes condições experimentais foram esquematizadas em D) controle; E) angiotensina II; e F) angiotensina II + CLI-095.

3.13 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular foi avaliada usando o kit *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA), baseado na descrição de Aguado e colaboradores (2013). Este protocolo teve o objetivo de investigar se o TLR4 participa do efeito da angiotensina II (100 nM) sobre a proliferação de CML Vs de ratos hipertensos.

Para isso, no último passe, após a tripsinização, as CML Vs foram semeadas em placas de 96 poços (*96-well Tissue Culture Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha*) em meio de cultura DMEM. Diferentemente dos demais protocolos experimentais, os pequenos poços da placa de 96-well recebiam uma quantidade pré-determinada de 4.000 células / poço. Para isso, após passe e tripsinização, as células foram contadas utilizando-se uma câmera de Neubauer (Figura 16) sob de uma lupa Leica 6SD (*Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha*). Após calcular e realizar a devida diluição, as células eram distribuídas nos poços, onde cresciam por 3 a 4 dias, quando alcançavam a confluência.

Após confluência, o meio de cultura das células foi trocado por meio de jejum (DMEM livre de FBS, suplementado com BSA a 0,1 %, além dos antibióticos P-S, o qual permaneceu por 24 horas, quando foi feito o estímulo com angiotensina II (100 nM), permanecendo por mais 24 horas, na presença prévia ou ausência de CLI-095 (1 μ M), por uma hora.

Em seguida, a resposta proliferativa foi quantificada pela adição de 20 μ L / poço de uma solução formada de: composto de tetrazolio MTS, reagente de acoplamento de elétrons e etosulfato de fenazina (PES) (*CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*). Após 2 a 3 horas de incubação a 37 °C, a absorbância foi medida a 490 nm utilizando um leitor de microplacas (*ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Áustria*). Os diferentes ensaios foram desenvolvidos em triplicado e ao controle, foi assumido o valor de 1 (um).

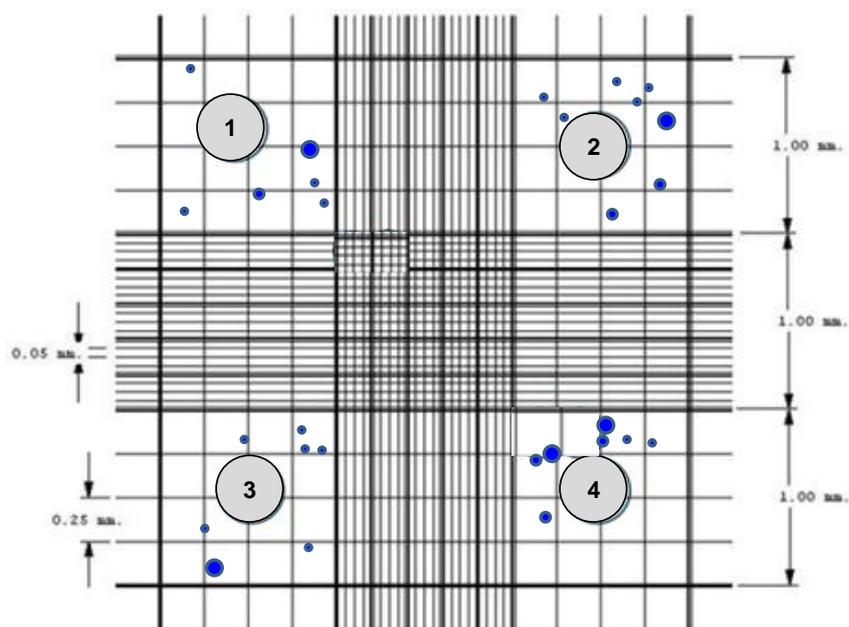


Figura 16 – Esquema representativo da visualização da contagem das células pela câmara de Neubauer.

Neste caso esquemático, foi visualizado (em azul) um total de 28 células, que, em média, permite estimar a quantidade de 7 células por campo ($28 \text{ células} / 4 \text{ campos}$). O cálculo foi realizado considerando que cada campo continha $0,1 \mu\text{L}$ de meio de cultura com as células. Neste caso, $0,1 \mu\text{L}$ de meio de cultura continham 5 células.

3.14 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foram utilizados os programas *Microsoft Office Excel* (Redmond, Washington, EUA) e *GraphPad Prism Software 5.0* (San Diego, Califórnia, EUA). Devido ao software *GraphPad Prism* estar configurado na língua inglesa, os valores decimais dos gráficos são delimitados por pontos, e não por vírgulas.

Os resultados encontram-se expressados como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de animais ou do número de cultivos celulares diferentes usados em cada experimento (n).

Em relação aos experimentos de reatividade vascular, foram calculados os valores de resposta máxima (Emax) e de pD_2 ($-\log EC_{50}$) das curvas concentração-resposta à fenilefrina e à acetilcolina através da análise de regressão não-linear de cada curva individualmente.

Para comparar o efeito da remoção do endotélio ou o efeito de alguns fármacos sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina ou vasodilatadora à acetilcolina, os resultados foram expressados através da diferença da área abaixo da curva (dAAC) de concentração-resposta nas situações controle (sem fármaco) e nas situações experimentais (remoção do endotélio ou na presença de fármacos). As diferenças das dAACs entre os grupos foram expressas como porcentagem.

Para variáveis de distribuição normal, as diferenças foram analisadas usando o teste t de *Student* pareado ou não pareado para comparação de duas médias. Para comparar três médias ou mais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma ou duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizadas. Quando o teste ANOVA detectava significância estatística, foi realizado o pós-teste (*pos-hoc*) de Bonferroni.

Para variáveis que não apresentavam distribuição normal, foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para análise entre os grupos estudados.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3.15 FÁRMACOS, REAGENTES e ANTICORPOS

- Acetilcolina, cloridrato: Sigma-Aldrich Co.
- Acrilamida (N, N`-Metilenbisacrilamida 40 % Solução 37, 5:1): BioRad
- Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*, BSA): Sigma-Aldrich Co.
- Alexa Fluor-546: Invitrogen
- Anticorpo IgG 2_a não-específico (sc-2026): Santa Cruz Biotechnology Inc.
- Anticorpo anti-TLR4 (monoclonal IgG2_a, sc-13591): Santa Cruz Biotechnology Inc.
- Anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -actina: Sigma-Aldrich Co.
- Anticorpo policlonal de coelho anti-COX-2: Cayman Chemical
- Anticorpo primário monoclonal específico anti- α -actina procedente de camundongo: Sigma-Aldrich Co.
- Anticorpo primário policlonal anti-TLR4: Santa Cruz Biotechnology Inc.
- Anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete IgG anti-coelho: BioRad
- Anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabanete IgG anti-camundongo: Stressgen Bioreagents Corporation
- Anticorpo secundário fluorescente anti-camundongo / FITC: Sigma-Aldrich Co.
- Anticorpo secundário produzido IgG anti-cabra conjugado ao marcador Alexa Fluor-546: Invitrogen-Molecular Probes Inc.
- Apocinina: Fluka, Sigma-Aldrich Co.
- Azul de bromofenol (3', 3'', 5', 5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódico): Sigma-Aldrich Co.
- CaCl₂.2H₂O (cloreto de cálcio dihidratado): Merck, Pancreac

- Carbogênio (95 % de O₂ e 5 % de CO₂): White Martins, Praxair, Inc.
- Catalase: Sigma-Aldrich Co.
- *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*: Promega
- CLI-095 (TAK 242): Invivogen
- Colagenase tipo II: Invitrogen-Gibco
- DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol): Invitrogen-Molecular Probes Inc.
- DEPC (dietilpirocarbonato): Sigma-Aldrich Co.
- Dihidroetídio (DHE): Invitrogen-Molecular Probes Inc.
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium): Sigma-Aldrich Co.
- DMSO (dimetilsulfóxido): Sigma-Aldrich Co.
- DNase I recombinante, RNase free: Roche
- EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético): Sigma-Aldrich Co.
- EGTA (ácido etilenoglicol tetraacético): Sigma-Aldrich Co.
- Etanol (96 %): Merck & Co.
- Fenilefrina, hidrocloreto: Sigma-Aldrich Co.
- FITC (isotiocianato de fluoresceína): Sigma-Aldrich Co.
- Glicerol: Sigma-Aldrich Co.
- Glicina (ácido aminoacético): Sigma-Aldrich Co.
- Glicogênio: Sigma-Aldrich Co.
- Glicose: Merck & Co.
- Heparina: Roche
- Inibidores de fosfatases: Sigma-Aldrich Co.

- Inibidores de proteases: Roche Diagnostics GmbH
- KCl (cloreto de potássio): Merck, Pancreac
- KH_2PO_4 (fosfato monopotássico): Merck, Pancreac
- Leite desnatado em pó: Nestlé
- L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil éster), dicloridrato: Sigma- Aldrich Co.
- Losartan: Merck & Co.
- Lucigenina (nitrato de bis-N-metilacridina): Sigma-Aldrich Co.
- Marcador de peso molecular 6 a 180 kDa: Nippon Genetics Europe
- Metanol: Sigma-Alcrich Co.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de magnésio heptahidratado): Merck, Pancreac
- Na_2 EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético, sal dissódico): Sigma-Aldrich Co.
- NaCl (cloreto de sódio): Merck, Pancreac
- NaHCO_3 (bicarbonato de sódio): Merck, Pancreac
- octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL CA-630): Sigma Aldrich Co.
- Paraformaldeído (PFA): Merck
- Penicilina / Estreptominina: Invitrogen-Gibco
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL plus): Amersham Life Science, Pharmacia Biotech
- *RIPA (radioimmunoprecipitation assay)*: Sigma-Aldrich Co.
- Sacarose: Merck
- SDS (dodecil sulfato sódico): Sigma-Aldrich Co.

- Solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) com Ca^{2+} e com Mg^{2+} : Invitrogen-Gibco
- Solução tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) sem Ca^{2+} e sem Mg^{2+} : Invitrogen-Gibco
- Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS): Reactiva S.A.
- *SyBR Green (iTaq FAST SyBR Green Supermix with ROX)*: Bio-Rad Laboratories
- *TaqMan Universal PCR Mastermix*: Applied Biosystems
- Temed (tetrametiletilenodiamina): Sigma-Aldrich Co.
- Tiron (4,5-dihidroxi-1,3-benzeno-dissulfônico): Sigma-Aldrich Co.
- Tripsina: Sigma
- *TRI-Reagent*: Sigma-Aldrich Co.
- Tris [tris(hidroximetil)aminometano]: Sigma-Aldrich Co.
- Tris-HCl: Sigma-Aldrich Co.
- Tween 20 (polioxietileno sorbitano 20): Sigma-Aldrich Co.
- Uretana: Sigma-Aldrich Co.
- β -mercaptoetanol (2-Hidroxietilmercaptano): Sigma-Aldrich Co.

Todos os fármacos foram diluídos em água destilada, exceto CLI-095, que foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO); 10 μl de DMSO não resulta em nenhum efeito sobre CMLVs.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS INICIAIS: EXPRESSÃO VASCULAR DE TLR4

4.1.1 Expressão vascular de RNAm de TLR4 é maior em ratos hipertensos

Os ratos utilizados para a quantificação de RNAm (através de qRT-PCR) eram pertencentes aos grupos Wistar controle e SHR controle, cujo peso corporal, no dia da extração da aorta, foi, em média, de $381,2 \pm 12,4$ g e $358,6 \pm 3,8$ g*, respectivamente (*p < 0,05 vs Wistar, teste t de Student não pareado). Era esperado que os ratos hipertensos apresentassem essa diminuição do peso corporal quando comparado aos ratos normotensos da mesma idade (aproximadamente 26 semanas).

Em relação à PAS medida por pletismografia de artéria caudal, foi verificado que o grupo Wistar controle apresentou $121,7 \pm 4,6$ mmHg e o grupo SHR controle $197,3 \pm 3,4$ mmHg (*p < 0,05 vs Wistar controle, teste t de Student não pareado), confirmando, desse modo, o aumento de pressão arterial esperado nos SHRs comparados aos ratos Wistar. Esses dados foram obtidos em animais de aproximadamente 26 semanas de idade. É importante esclarecer que os valores de pressão arterial em ratos e camundongos são semelhantes aos dos humanos, sendo que os valores considerados normais ou hipertensos para humanos são, também, semelhantes para esses roedores.

Foi constatado que a expressão de RNAm do receptor TLR4 foi maior em segmentos de aorta de SHRs, e também em CMLVs, quando comparada aos ratos Wistar. Os valores obtidos foram a) em segmentos de aorta de ratos Wistar controle: $1,02 \pm 0,1$ e de SHRs controle: $2,79 \pm 0,4^*$; e b) em CMLV de Wistar controle: $1,09 \pm 0,3$; e de SHRs controle: $4,01 \pm 0,7$ (*p < 0,05 vs Wistar controle, teste não paramétrico de Mann-Whitney) (Figura 17A-B).

Para confirmar que este aumento de RNAm vascular em ratos hipertensos resultou em aumento efetivo de receptores TLR4 na parede arterial, foram realizados os experimentos de imunofluorescência, com a utilização do corante Alexa Fluor-546. Esses experimentos confirmaram, de fato, o aumento do receptor TLR4 em ratos SHR controle em relação aos ratos Wistar controle, bem como, demonstraram a localização do receptor nas três camadas da parede arterial: endotelial, média e adventícia (Figura 18).

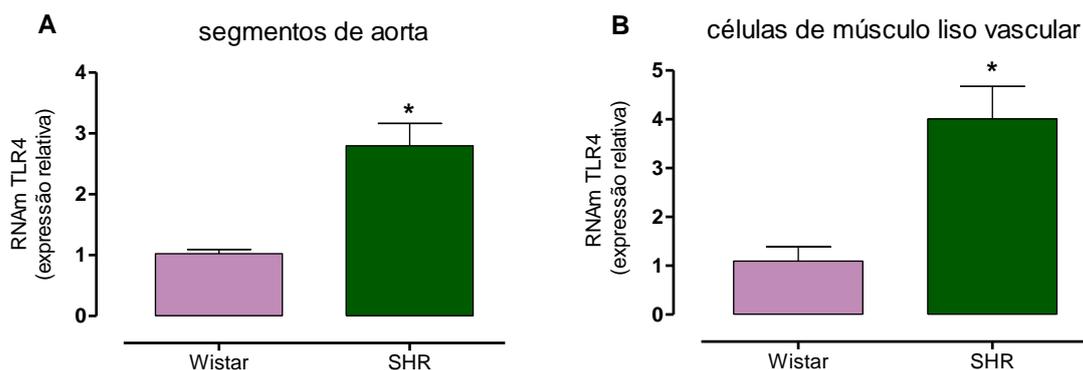


Figura 17 – Expressão de RNAm de TLR4 vascular é maior em ratos hipertensos que normotensos.

Comparação dos níveis de RNAm de TLR4 em ratos Wistar (n = 6) e SHRs (n = 7) observada em: A) segmentos de aorta; B) células de músculo liso vascular. Resultados expressados como média \pm EPM da expressão relativa de RNAm encontrada em ratos Wistar. * $p < 0,05$ vs Wistar controle, teste não paramétrico de Mann-Whitney. Número de unidades experimentais representado por n.

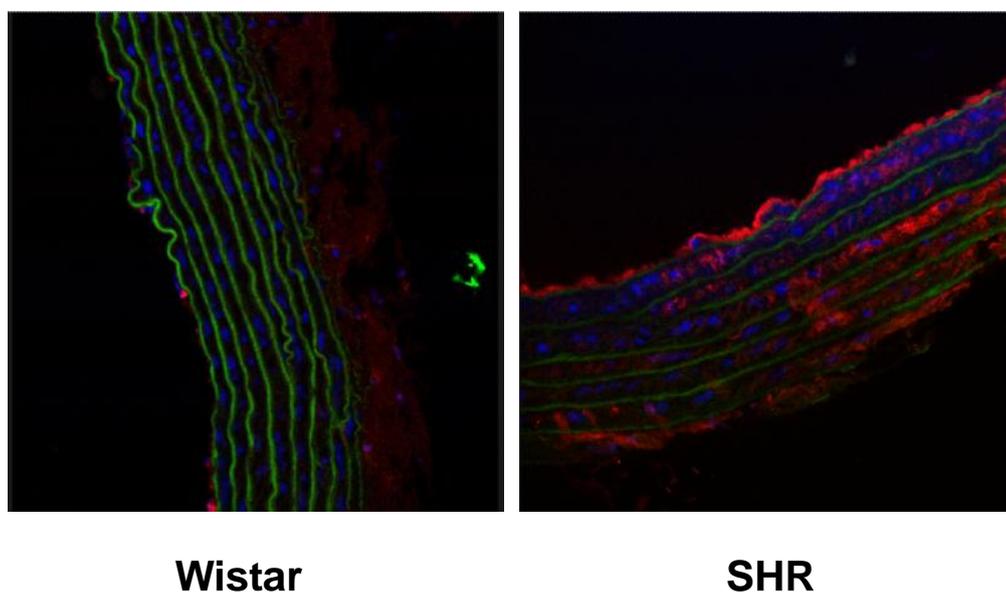


Figura 18 – Receptor TLR4 está localizado nas três camadas da aorta, estando mais presente em ratos SHR do que em Wistar. Fotomicrografias confocais fluorescentes representativas da imunolocalização do receptor TLR4 nos segmentos de aorta de ratos Wistar e SHR controles, através da utilização do corante Alexa Fluor 546 (tamanho da imagem: 238 X 238 μ m).

A cor vermelha nas fotos permite a visualização do TLR4; em azul, dá-se a coloração dos núcleos com DAPI e a autofluorescência dos componentes elásticos da parede arterial pode ser visualizada na cor verde.

4.1.2 Angiotensina II contribui para o aumento da expressão gênica de TLR4 em ratos SHR

Para alcançar os resultados descritos nesta seção, foram utilizados os ratos dos grupos Wistar e SHR controles, e também do grupo SHR losartan, antagonista do receptor AT1 da angiotensina II, tratados com 15 mg / Kg · dia, na água de beber, durante 12 semanas.

O peso corporal dos animais dos grupos SHR controle e losartan foram acompanhados durante todo o tratamento, sem diferença entre os grupos (Figura 19), sugerindo que este tratamento com losartan não influencia o ganho de peso corporal de ratos SHR. No início do tratamento, com aproximadamente 14 semanas de idade, os SHRs controle apresentaram $287,7 \pm 7,6$ g e os SHRs losartan $289,1 \pm 4,8$ g; e no fim do tratamento, com cerca de 26 semanas de idade, os SHRs controle tinham a média de peso de $358,6 \pm 3,8$ g e os tratados com losartan de $369,7 \pm 4,7$ g.

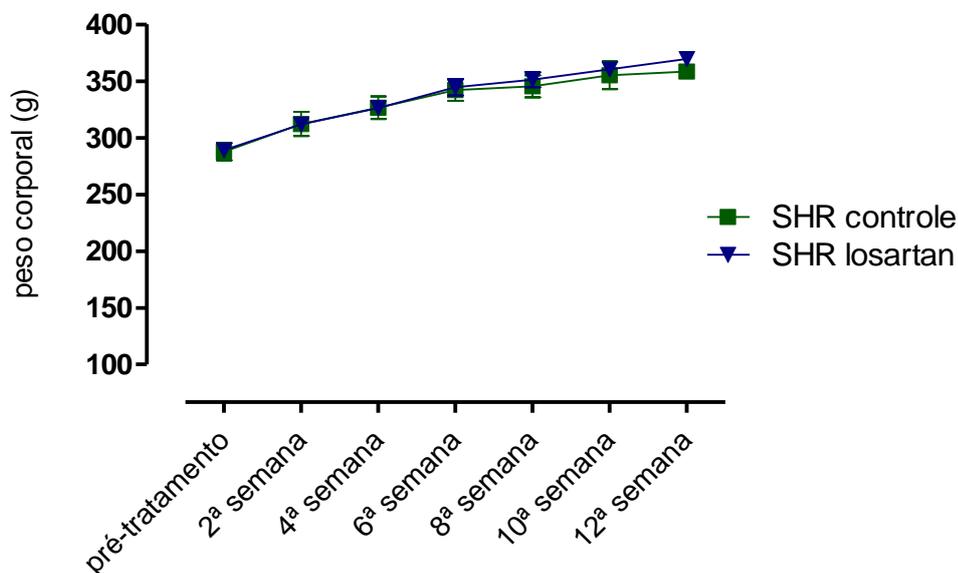


Figura 19 – Tratamento com losartan não influencia no ganho de peso corporal de ratos SHR.

Comparação do peso corporal (em gramas, g) entre os grupos SHR controle (n = 7) e SHR losartan (n = 7), a cada duas semanas, e ao longo das 12 semanas de tratamento com losartan (15 mg / Kg · dia, na água de beber). Resultados expressados como média ± EPM. $p > 0,05$, ANOVA duas-vias. Número de animais representado por n.

A medida indireta da PAS por pletismografia da artéria caudal permitiu verificar a redução esperada da pressão arterial diante do tratamento com losartan (Figura 20), o qual foi mensurado a cada duas semanas, durante todo o tratamento que durou 12 semanas (Tabela 1).

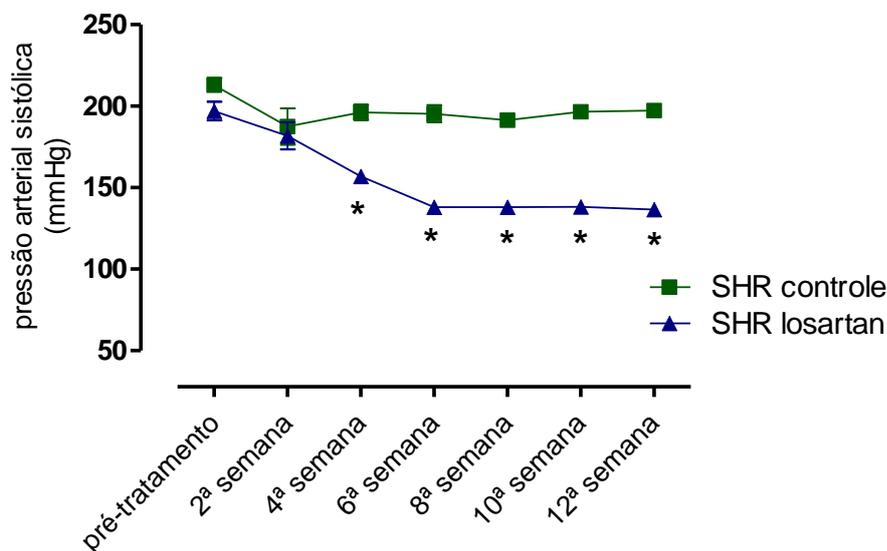


Figura 20 – Losartan reduz pressão arterial sistólica de ratos hipertensos.

Comparação da Pressão Arterial Sistólica (PAS) (em mmHg) entre os grupos SHR controle (n = 7) e SHR losartan (n = 7), a cada duas semanas, ao longo das 12 semanas de tratamento com losartan. Resultados expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs SHR controle; ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni. Número de ratos expresso por n.

Tabela 1 – Valores de pressão arterial sistólica (PAS), em mmHg, obtidos por pletismografia da artéria caudal de ratos SHR controle e SHR tratados com losartan (15 mg / Kg . dia, na água de beber).

Momento da aferição	SHR controle	SHR losartan
	n = 7	n = 7
pré-tratamento	212,9 ± 4,3	196,9 ± 5,7
2ª semana tratamento	187,5 ± 11,1	181,7 ± 8,2
4ª semana tratamento	196,1 ± 4,5	156,8 ± 3,4*
6ª semana tratamento	195,3 ± 5,2	137,9 ± 3,9*
8ª semana tratamento	191,3 ± 2,3	138,1 ± 1,4*
10ª semana tratamento	196,6 ± 3,6	138,2 ± 0,8*
12ª semana tratamento	197,3 ± 3,4	136,6 ± 0,5*

Valores expressados como média ± EPM.

*p < 0,05 vs SHR controle, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

Através de experimentos de qRT-PCR em segmentos de aorta também de ratos do grupo SHR losartan, foi observado que o aumento da expressão de RNAm do TLR4 em ratos hipertensos, demonstrado anteriormente, é reduzido após o tratamento com losartan. Isso sugere que a angiotensina II, através de seu receptor AT_1 , participa do incremento da expressão do TLR4 em artérias de ratos hipertensos. Níveis de RNAm de TLR4 em segmentos de aorta de ratos dos grupos: 1) Wistar controle $1,02 \pm 0,1$; 2) SHR controle $2,79 \pm 0,4$; e 3) SHR losartan $1,5 \pm 0,2$ comparados através de teste não paramétrico de Mann-Whitney, podem ser observados na Figura 21.

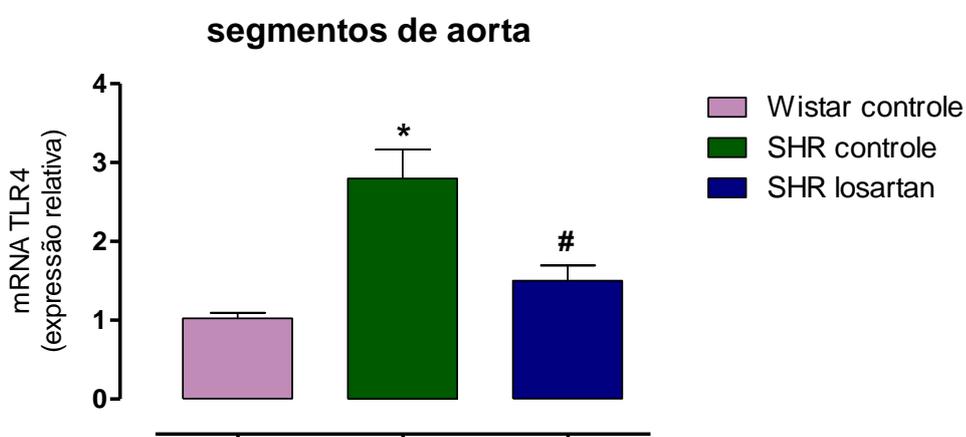


Figura 21 – Angiotensina II, através do receptor AT_1 , contribui para o aumento dos níveis de RNAm de TLR4 observado em aortas de SHRs.

Comparação dos níveis de RNAm de TLR4 em ratos Wistar ($n = 6$), SHRs controles ($n = 7$), e SHR tratados com losartan ($n = 7$) (15 mg / Kg . dia, na água de beber), observada em segmentos de aorta. Resultados expressados como média \pm EPM da expressão relativa de RNAm encontrada nos ratos Wistar. * $p < 0,05$ vs Wistar controle; # $p < 0,05$ vs SHR controle; teste não paramétrico de Mann-Whitney. Número de unidades experimentais representado por n.

4.2 RESULTADOS OBTIDOS EM RATOS TRATADOS COM ANTI-TLR4

4.2.1 Inibição de TLR4 reduz a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos hipertensos

As descrições desta e das seções que envolvem as medidas hemodinâmicas diretas e os estudos de reatividade vascular referem-se à sequência de experimentos que utilizou ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4, tratados por 14 dias com os respectivos anticorpos (1 µg / dia diluído em salina, via intraperitoneal).

Foi observado que os animais SHR IgG apresentavam menor peso corporal que os ratos Wistar IgG, do mesmo modo em que foi analisado nos grupos Wistar controle e SHR controle, conforme descrição anterior. Por sua vez, o tratamento com anticorpo anti-TLR4 não foi capaz de modificar o peso corporal entre os grupos SHR analisados, o qual foi mensurado antes do tratamento, após setes dias e ao final do tratamento com anticorpo, no dia do experimento. (Tabela 2; Figura 22).

Adicionalmente, observou-se que o tratamento com anticorpo IgG não específico – nos grupos Wistar IgG e SHR IgG – não modificou o peso corporal quando comparado aos animais Wistar e SHRs dos grupos controles supracitados, o que foi analisado em todos os grupos entre 13 e 14 semanas de idade (SHR controle: $287,7 \pm 7,6$ vs SHR IgG: $289,8 \pm 7,6$, $p > 0,05$, teste t de Student; Wistar controle: $311,4 \pm 13,2$ vs Wistar IgG: $322,8 \pm 10,4$, $p > 0,05$, teste t de Student).

Tabela 2 – Valores de peso corporal, em gramas, de ratos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 tratados por 14 dias com os respectivos anticorpos (1 µg / dia diluído em salina, via intraperitoneal).

momento da aferição	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4
	n = 10	n = 9	n = 10
Dia 0 de tratamento	$284,7 \pm 11,3$ g	$245,8 \pm 12,4$ g*	$258,5 \pm 10,9$ g*
Dia 7 de tratamento	$303,1 \pm 9,9$ g	$268,4 \pm 11,9$ g*	$271,2 \pm 10,6$ g*
Dia 15 de tratamento	$322,8 \pm 10,4$ g	$289,8 \pm 7,6$ g*	$281,5 \pm 10,7$ g*

Valores expressados como média \pm EPM.

* $p < 0,05$ vs Wistar IgG, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

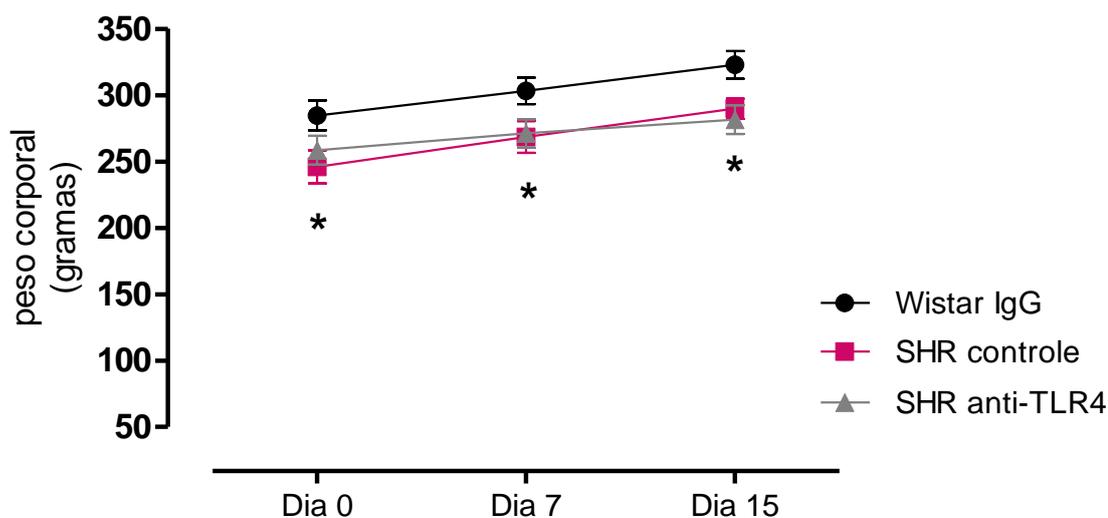


Figura 22 – SHR apresenta menor peso corporal que ratos Wistar.

Comparação do peso corporal (em gramas, g) entre os grupos Wistar IgG (n = 10), SHR IgG (n = 9) e SHR anti-TLR4 (n = 10), obtido antes (Dia 0), uma semana após (Dia 7) e ao final do tratamento (Dia 15) com 1 µg do respectivo anticorpo / dia, via intraperitoneal. Resultados expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs Wistar IgG; ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni. Número de animais experimentais representado por n.

As medidas hemodinâmicas diretas confirmaram que animais SHR apresentam aumento da pressão arterial (sistólica, diastólica e média) quando comparado aos normotensos. Além disso, os SHRs apresentaram maior FC que os ratos Wistar. E com a finalidade de investigar se o TLR4 participa desta elevação da pressão arterial dos ratos hipertensos, foi realizada a comparação com os ratos SHR do grupo anti-TLR4. Diante do tratamento realizado, a PAS, PAD, PAM e FC foram reduzidas, conforme pode ser observado na Figura 23A-D, ainda que continuem sendo maiores que as medidas obtidas nos ratos Wistar IgG. Os valores encontram-se na Tabela 3.

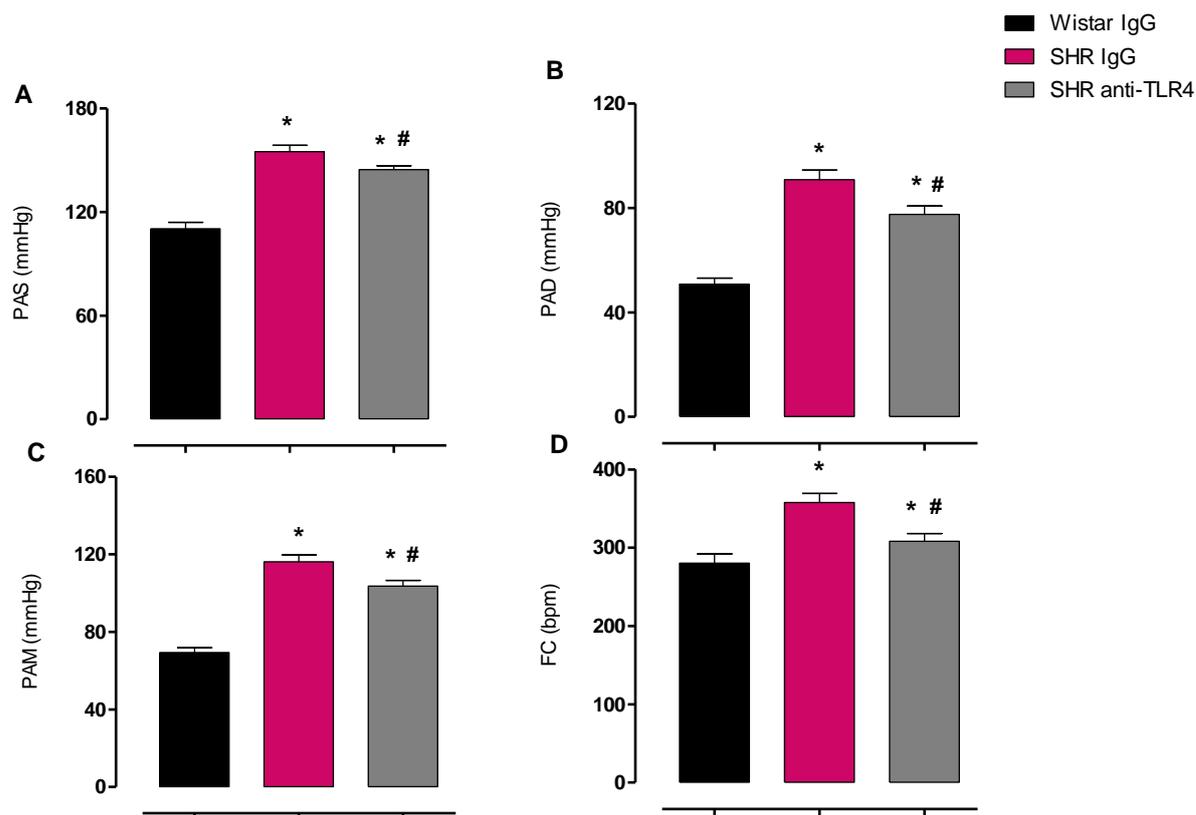


Figura 23 – Inibição do TLR4 reduz pressão arterial e frequência cardíaca de ratos hipertensos.

A) Pressão Arterial Sistólica (PAS), B) Pressão Arterial Diastólica, C) Pressão Arterial Média (PAM) e, D) Frequência Cardíaca dos ratos dos grupos Wistar (n = 10), SHR IgG (n = 9) e SHR anti-TLR4 (n = 10), tratados com 1 µg do respectivo anticorpo / dia, via intraperitoneal, durante 14 dias. Medidas hemodinâmicas obtidas após o 15^o dia de tratamento. Resultados expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs Wistar IgG; #p < 0,05 vs SHR IgG, ANOVA uma-avia e pós-teste de Bonferroni. Número de animais experimentais representado por n.

Tabela 3 – Medidas hemodinâmicas de ratos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 após 14 dias de tratamento com anticorpo. PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; PAM: Pressão Arterial Média; FC: Frequência Cardíaca.

Parâmetro	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4
	n = 10	n = 9	n = 10
PAS (mmHg)	110,37 ± 10,54	155,00 ± 12,36*	144,66 ± 7,27*#
PAD (mmHg)	50,81 ± 6,49	90,91 ± 11,97*	77,54 ± 10,24*#
PAM (mmHg)	69,31 ± 7,14	116,13 ± 11,63*	103,63 ± 9,41*#
FC (bpm)	280,36 ± 33,33	357,86 ± 38,01*	308,18 ± 31,39*#

Valores expressados como média ± EPM.

*p < 0,05 vs Wistar IgG; #p < 0,05 vs SHR IgG; ANOVA uma- via e pós-teste de Bonferroni.

4.2.2 Tratamento com 1 µM / dia de anti-TLR4 por 14 dias não influencia o peso do coração e o crescimento ósseo de ratos hipertensos

O peso do coração ou o comprimento da tíbia não foram diferentes entre os três grupos estudados (Figura 24A-B). Entretanto, os animais SHRs apresentaram maior razão peso coração / comprimento da tíbia (Figura 24C), obtida para se estimar a hipertrofia cardíaca, embora não tenha sido encontrada diferença estatística (Wistar IgG: 0,29 ± 0,01; SHR IgG: 0,35 ± 0,02*; *p = 0,068 vs Wistar controle, ANOVA uma via e pós-teste de Bonferroni). O tratamento com anti-TLR4 nos SHRs não afetou o peso do coração e o crescimento ósseo de ratos hipertensos, tão pouco a razão entre esses parâmetros (Tabela 4).

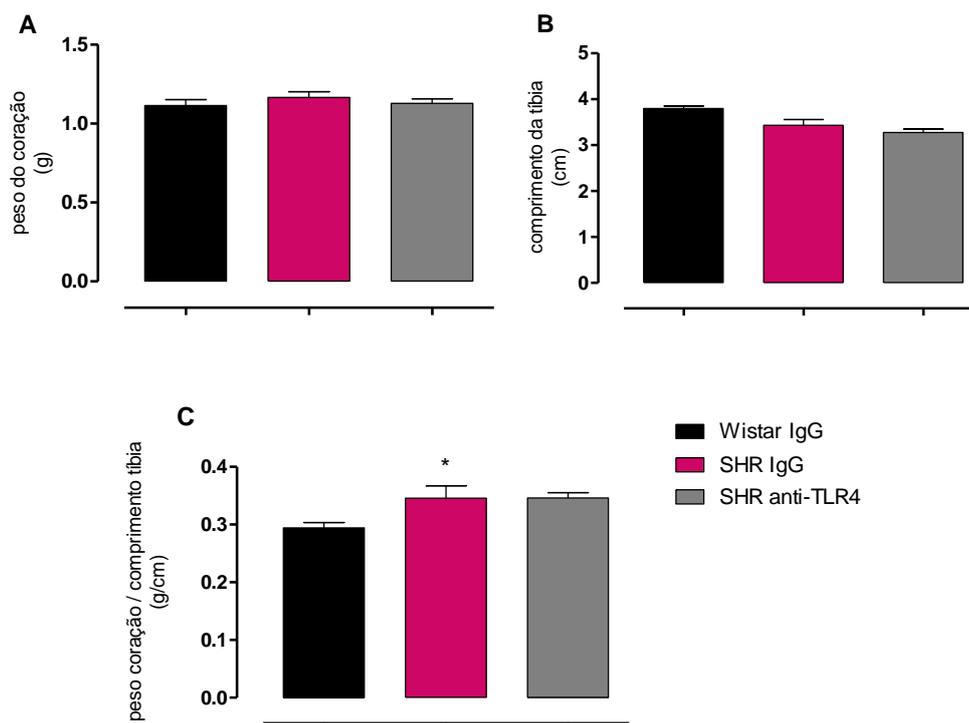


Figura 24 – Tratamento com anti-TLR4 não afeta o peso do coração, o comprimento da tíbia e a razão entre esses parâmetros.

A) Peso do coração (g), B) Comprimento da tíbia (cm), C) Razão peso do coração / comprimento da tíbia (g/cm) dos ratos dos grupos Wistar (n = 10), SHR IgG (n = 9) e SHR anti-TLR4 (n = 10). Resultados expressados como média \pm EPM. $p^* = 0,068$ vs Wistar IgG, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de animais experimentais representado por n.

Tabela 4 – Valores obtidos do peso do coração (g), comprimento da tíbia (cm) e da razão peso do coração/comprimento (g/cm) da tíbia nos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4 tratados com anticorpo por 14 dias.

parâmetro	Wistar IgG n = 10	SHR IgG n = 9	SHR anti-TLR4 n = 10
peso coração (g)	1,114 \pm 0,038	1,167 \pm 0,035	1,129 \pm 0,028
comprimento tíbia (cm)	3,800 \pm 0,053	3,433 \pm 0,126	3,275 \pm 0,073
peso coração/comprimento tíbia (g/cm)	0,294 \pm 0,009	0,346 \pm 0,022*	0,346 \pm 0,009

Valores expressados como média \pm EPM.

* $p = 0,068$ vs Wistar IgG, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni

4.2.3 Hipertensão arterial prejudica a integridade endotelial de anéis de aorta de ratos

Para dar início aos protocolos de reatividade vascular, foi avaliada a integridade dos componentes da aorta. Inicialmente foi testado o componente funcional do músculo liso vascular, cuja contração máxima induzida por 75 mM KCl foi similar nos anéis de aorta dos três grupos estudados: Wistar IgG ($1,86 \pm 0,09$ g); SHR IgG ($1,92 \pm 0,08$ g); SHR anti-TLR4 ($1,7 \pm 0,08$ g); $p > 0,05$, ANOVA uma-via (Figura 25A).

Depois de testada a integridade do músculo liso, foi realizado o teste do endotélio, que avaliou a capacidade do endotélio promover vasodilatação frente a 10 μ M de acetilcolina após pré-contração com 1 μ M de fenilefrina. Tal pré-contração com fenilefrina foi similar entre os grupos. E em relação ao relaxamento dependente do endotélio induzido por uma única dose de acetilcolina (10 μ M), os animais hipertensos apresentaram prejuízo desta função, em relação aos normotensos (Wistar IgG: $92,53 \pm 1,22$ %; SHR IgG: $78,29 \pm 1,29$ %*; SHR anti-TLR4: $82,66 \pm 1,31$ %*; * $p < 0,05$, vs Wistar IgG, ANOVA uma-via, seguido de pós-teste de Bonferroni (Figura 25B).

Conforme era esperado, artérias de ratos hipertensos apresentaram a camada endotelial comprometida, com redução do relaxamento diante do teste do endotélio. Inclusive, por este motivo, os valores limítrofes para considerar o anel de aorta *íntegro* e, assim, a viabilidade de realização dos experimentos sob uma condição parecida, foram assumidos valores menores para aorta de SHRs. Assim, para os ratos SHR foi considerado um relaxamento igual ou superior a 70 %, diferente dos 85 % de relaxamento mínimo dos ratos Wistar, ambos em relação à contração máxima provocada pela fenilefrina previamente.

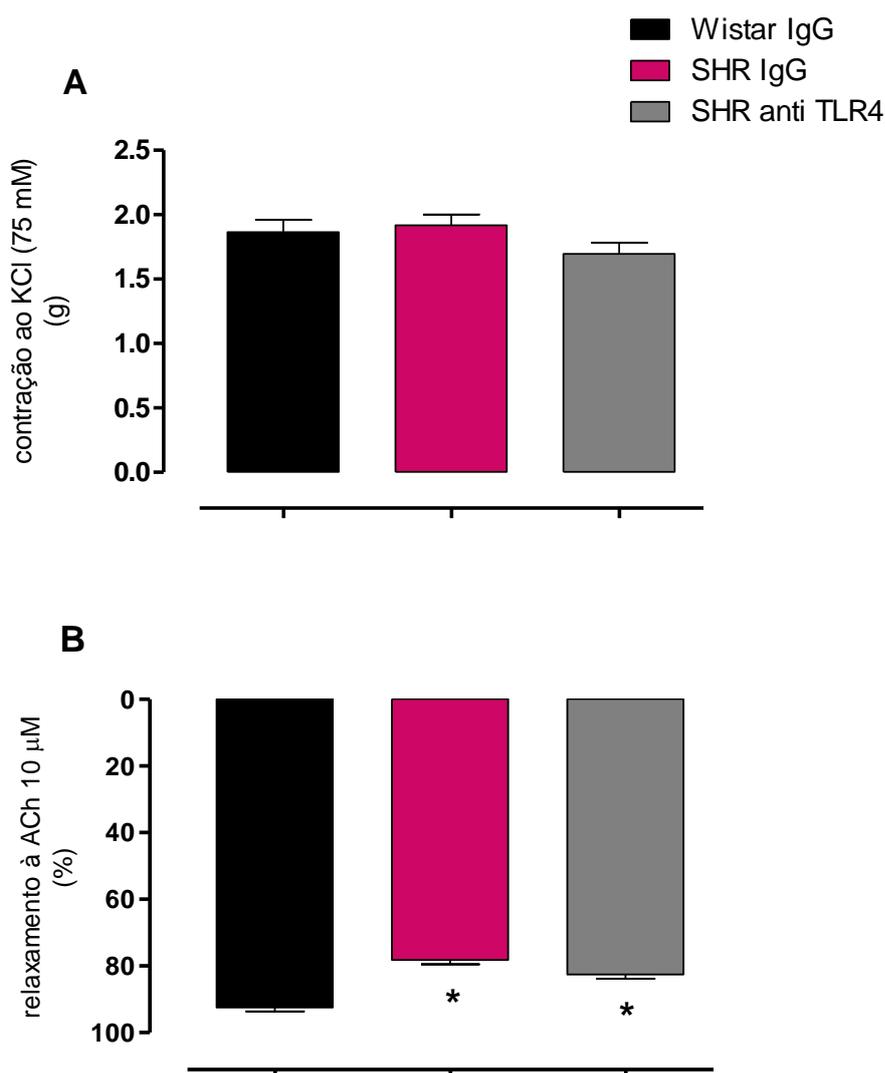


Figura 25 – Hipertensão arterial prejudica a integridade endotelial de anéis de aorta.

A) Não houve diferenças entre os grupos em relação à integridade muscular lisa ao contrair-se diante de 75 mM de KCl; B) Ratos SHR IgG (n = 9) e anti-TLR4 (n = 10) apresentaram prejuízo no relaxamento via endotélio quando comparados aos ratos Wistar (n = 10). Inibição com anti-TLR4 não foi capaz de minimizar de forma significativa esse prejuízo. Resultados expressados como média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs Wistar IgG, ANOVA uma- via e pós-teste de Bonferroni. Número de animais experimentais representado por n.

4.2.4 SHRs apresentam aumento da vasoconstrição induzida por fenilefrina e prejuízo do relaxamento induzido por acetilcolina

Diante da realização das curvas concentração-resposta desenvolvidas com doses crescentes de fenilefrina (0,1 nM a 0,3 mM), foi observado que os ratos hipertensos apresentaram maior responsividade contrátil à fenilefrina, em comparação com os ratos normotensos, como já era esperado (Figura 26A).

Do mesmo modo, mediante o desenvolvimento das curvas concentração-resposta à acetilcolina, com o acréscimo crescente de doses deste fármaco (0,01 nM a 0,3 mM), as aortas de ratos hipertensos apresentaram prejuízo no relaxamento dependente do endotélio (Figura 26B).

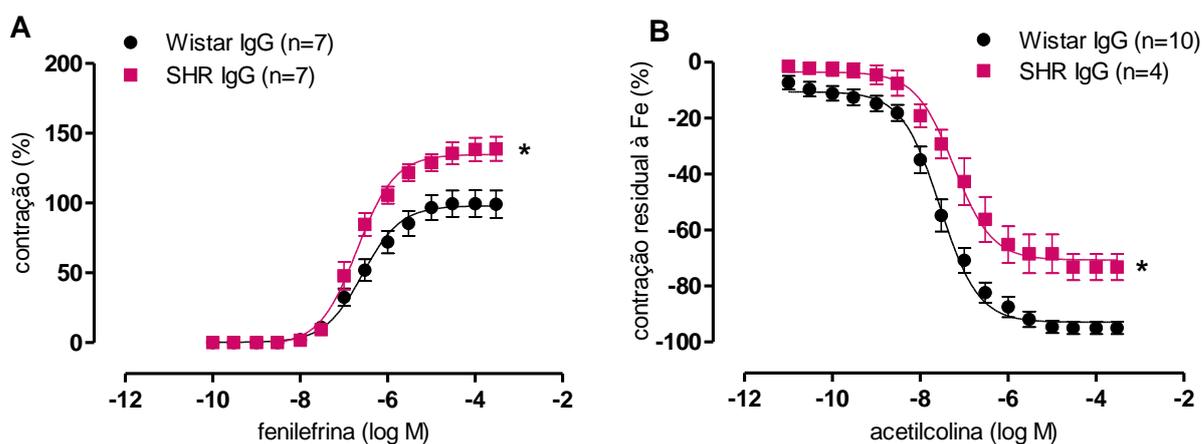


Figura 26 – Ratos SHR apresentam aumento da vasoconstrição induzida por fenilefrina e prejuízo do relaxamento induzido por acetilcolina.

A) Curvas concentração-resposta à fenilefrina e B) Curvas concentração resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos Wistar IgG e SHR IgG. Resultados expressados como média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs Wistar IgG, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni. Número de animais utilizados (n) está representado entre parênteses.

Conforme mencionado, esse resultado também era esperado, uma vez que aortas de SHRs apresentam prejuízo da função endotelial ao promover relaxamento do músculo liso vascular.

4.2.4.1 Tratamento com anticorpo anti-TLR4 reduz o incremento da vasoconstrição induzida por fenilefrina e melhora a vasodilatação à acetilcolina em SHRs

A resposta vasoconstritora induzida pela curva concentração-resposta à fenilefrina em aortas de ratos hipertensos foi menor no grupo SHR anti-TLR4, que recebeu tratamento com 1 μ g / dia de anticorpo anti-TLR4, durante 14 dias. De modo similar, a inibição do TLR4 através do anticorpo foi capaz de melhorar a resposta vasodilatadora frente à curva concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de SHRs pré-contraídas com fenilefrina, ou seja, esta resposta foi aumentada no grupo SHR anti-TLR4. Adicionalmente, vale ressaltar que as curvas realizadas nos

animais tratados com anti-TLR4 são semelhantes às obtidas nos grupos de animais Wistar (Figura 27A-D; Tabela 5).

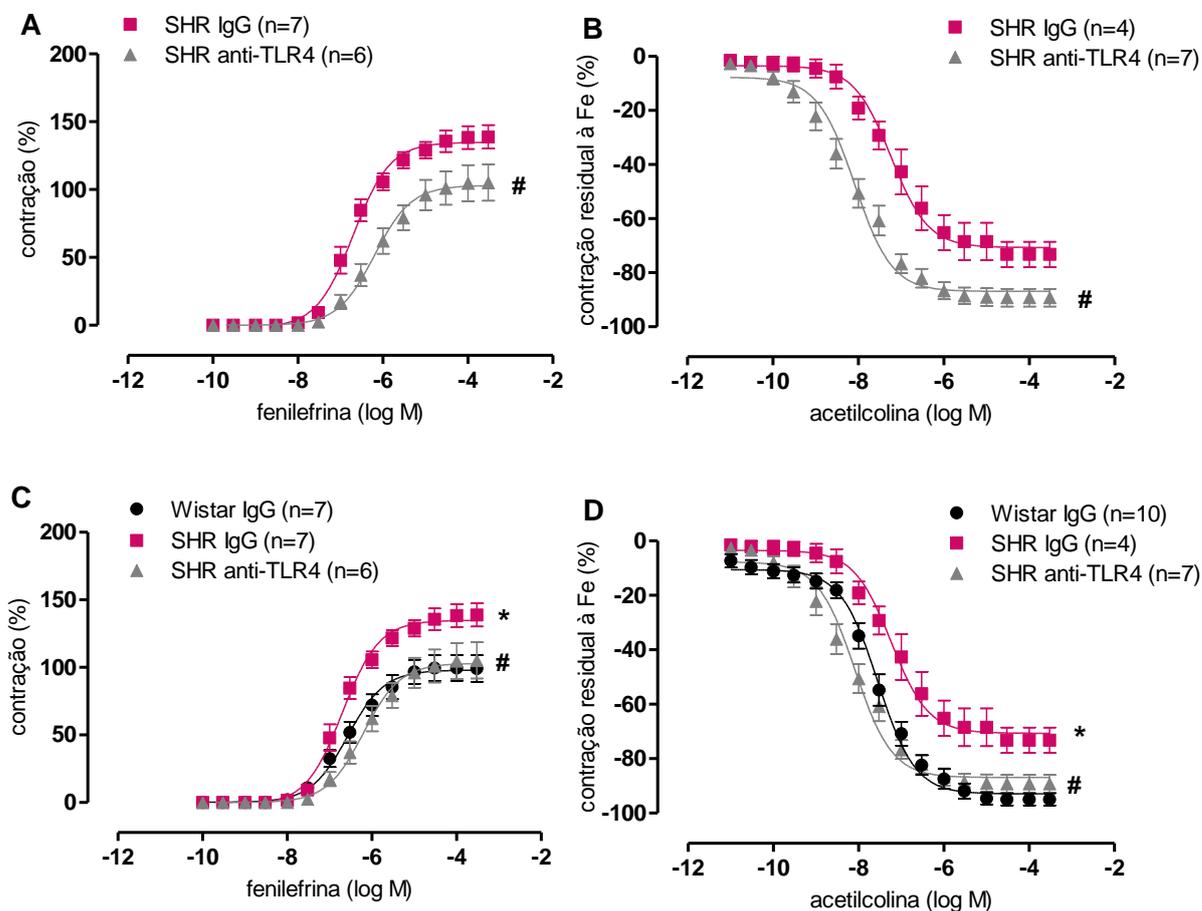


Figura 27 – Inibição de TLR4 reduz o incremento da vasoconstrição causada por fenilefrina e melhora a vasodilatação em aortas de ratos hipertensos.

Curvas concentração resposta à fenilefrina e à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos SHR IgG e SHR anti-TLR4 (A e B, respectivamente). Curvas concentração-resposta à fenilefrina e à acetilcolina comparativas entre os três grupos estudados (C e D, respectivamente). Resultados expressados como média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs Wistar IgG, $\#p < 0,05$ vs SHR IgG, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni. Número de animais utilizados (n) está representado entre parênteses.

Tabela 5 – Valores de pD₂ e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe, 0,1 nM – 0,3 mM) e à acetilcolina (ACh, 0,01 nM – 0,3 mM) em anéis de aorta de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4, tratados por 14 dias com anticorpo.

	pD ₂			R _{max} (% contração residual à Fe)		
	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4
Fe	6,57 ± 0,08	6,69 ± 0,12*	6,19 ± 0,09#	99,2 ± 9,8	138,8 ± 8,6*	105,2 ± 13,4#
ACh	7,54 ± 0,09	7,23 ± 0,13*	8,08 ± 0,10#	-94,9 ± 2,2	-73,2 ± 4,7*	-89,2 ± 3,3#

Valores expressados como média ± EPM.

*p < 0,05 vs Wistar IgG; #p < 0,05 vs SHR IgG; ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

4.2.5 Ratos hipertensos apresentam prejuízo da participação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina

Para investigar se a hipertensão modifica a influência do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina, esta camada foi removida mecanicamente, participando do protocolo os anéis de aorta que apresentaram relaxamento de menos que 10 % diante do teste de integridade endotelial.

Sendo assim, na ausência do endotélio (E-), a vasoconstrição à fenilefrina observada diante de curvas concentração-resposta a este fármaco foi aumentada nos grupos analisados Wistar e SHR IgG, entretanto, com menor magnitude no grupo SHR IgG (Figura 28A-B).

A comparação entre a magnitude do deslocamento para a esquerda da curva E-, quando comparada à curva controle (E+), foi demonstrada através do cálculo da diferença da área abaixo da curva (dAAC) entre os grupos (dAAC Wistar IgG: 134,07 ± 32,08 %; SHR IgG: 52,35 ± 7,28 %*; *p < 0,05 vs Wistar IgG, teste t Student não pareado). A área da curva controle (E+) de cada grupo foi considerada 100 % da contração, com a qual foi comparada a área deslocada pela curva E- (Figura 28C).

Esse resultado sugere que a hipertensão arterial prejudica a participação do endotélio sobre a resposta vascular à fenilefrina em anéis de aorta.

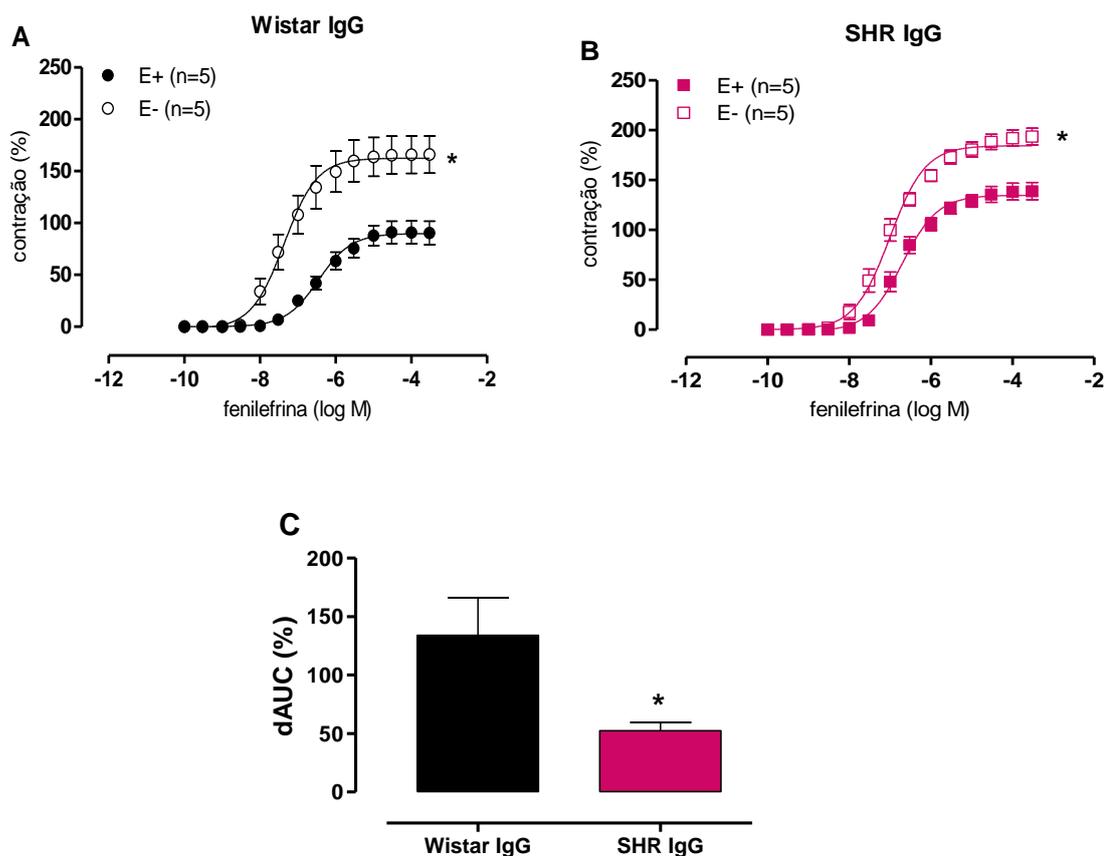


Figura 28 – Ratos hipertensos apresentam prejuízo da participação endotelial na resposta vasoconstritora à fenilefrina.

Curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas em anéis de aorta com presença (E+) ou ausência de endotélio (E-) em ratos Wistar IgG (A) e em SHR IgG (B). Comparação entre os grupos através do cálculo da área abaixo da curva (dAAC). Resultados expressados em média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs E+, ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni (A e B); $*p < 0,05$ vs Wistar IgG, teste t de Student não pareado (C). Número de animais (n) entre parênteses.

4.2.5.1 Tratamento com anticorpo anti-TLR4 reestabelece a participação do endotélio na resposta vascular induzida por fenilefrina

Para avaliar o efeito do tratamento com anti-TLR4 sobre a participação endotelial na vasoconstrição à fenilefrina, foi realizada a comparação do grupo SHR anti-TLR4 com os demais (Figura 29A-C). Conforme ocorreu com os ratos Wistar IgG e SHR IgG, os animais do grupo SHR anti-TLR4 também apresentaram maior reatividade vascular à fenilefrina na ausência do endotélio (E-), ou seja, deslocamento da curva para a esquerda, quando comparada com sua própria curva controle (E+).

Todavia, a partir da análise da área abaixo da curva (AAU) (Figura 29D), foi observado que os ratos SHR anti-TLR4 apresentaram maior participação endotelial que os ratos hipertensos controle (SHR IgG). (Tabela 6) Este aumento sugere que a inibição do TLR4 proporciona maior modulação do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina, tornando esta modulação similar à observada em animais normotensos (dAUC Wistar IgG $134,07 \pm 32,08$ %; SHR IgG: $52,35 \pm 7,28$ %*; SHR anti-TLR4: $120,51 \pm 17,09$ %[#], * $p < 0,05$ vs Wistar IgG, [#] $p < 0,05$ vs SHR IgG, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni).

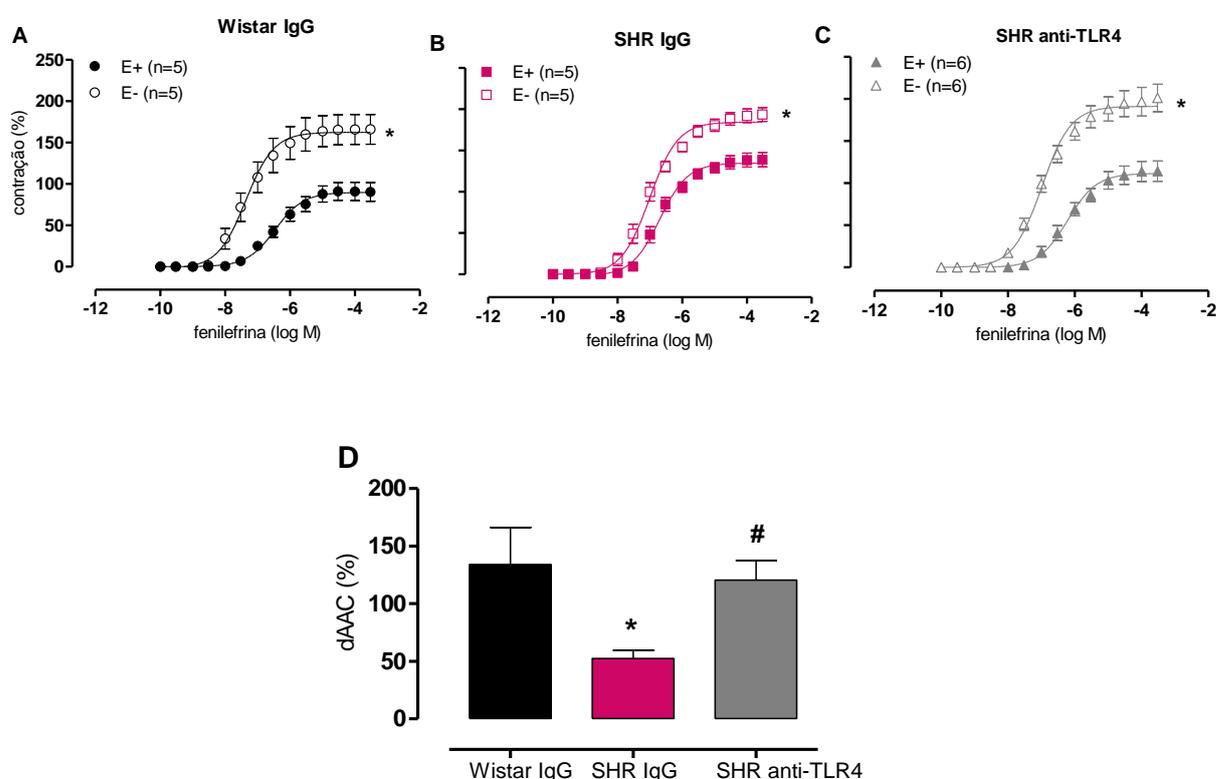


Figura 29 – Tratamento com anti-TLR4 reestabelece a participação do endotélio na resposta vascular induzida por fenilefrina.

Curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas em anéis de aorta com presença (E+) ou ausência de endotélio (E-) em ratos Wistar IgG (A), em SHR IgG (B) e em SHR anti-TLR4 (C). Comparação entre os grupos através do cálculo da área abaixo da curva (dAAC) (D). Resultados expressados em média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs E+ (A-C), ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni; $p^* < 0,05$ vs Wistar IgG, $p^{\#} < 0,05$ vs SHR IgG (D), ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de animais (n) entre parênteses.

Tabela 6 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos nas curvas concentração-resposta à fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) na presença (E+) e ausência de endotélio (E-) em ratos dos grupos Wistar e SHR IgG e SHR anti-TLR4 tratados por 14 dias com anticorpo.

	pD_2			R_{max} (% contração)		
	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4
E+	6,57 ± 0,08	6,69 ± 0,12	6,19 ± 0,09	99,2 ± 9,8	138,8 ± 8,6	105,2 ± 13,4
E-	7,36 ± 1,22*	7,01 ± 0,10*	6,99 ± 0,08*	166,1 ± 18*	193,6 ± 8,3*	201,2 ± 16,3*

Valores expressados como média ± EPM. *p < 0,05 vs E+, teste t de Student pareado.

4.2.6 A hipertensão reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico e o tratamento com anti-TLR4 reverte esta alteração

Para avaliar a liberação basal de óxido nítrico nos grupos estudados, foi analisada a tensão desenvolvida por L-NAME (100 μ M) após contração com uma única dose de fenilefrina (1 μ M).

L-NAME promoveu menor resposta contrátil nos segmentos de aorta de ratos SHR IgG quando comparados aos Wistar IgG, conforme esperado, visto que a hipertensão cursa com redução da biodisponibilidade de óxido nítrico.

Analisando este mesmo protocolo experimental, o tratamento com anticorpo anti-TLR4 provoca aumento da resposta contrátil frente ao L-NAME em relação ao grupo SHR IgG, o que sugere aumento na produção de óxido nítrico naqueles animais, comparados ao seu respectivo controle.

Os resultados do tônus vascular adicional causado por L-NAME foram expressados como porcentagem da contração prévia causada por 1 μ M de fenilefrina (Wistar IgG: 147,33 ± 14,23 %; SHR IgG: 57,57 ± 7,27 %*; SHR anti-TLR4: 117,00 ± 21,49 %[#]. *p < 0,05 vs Wistar IgG, [#]p < 0,05 vs SHR IgG, ANOVA uma-via, seguida de pós-teste de Bonferroni) (Figura 30).

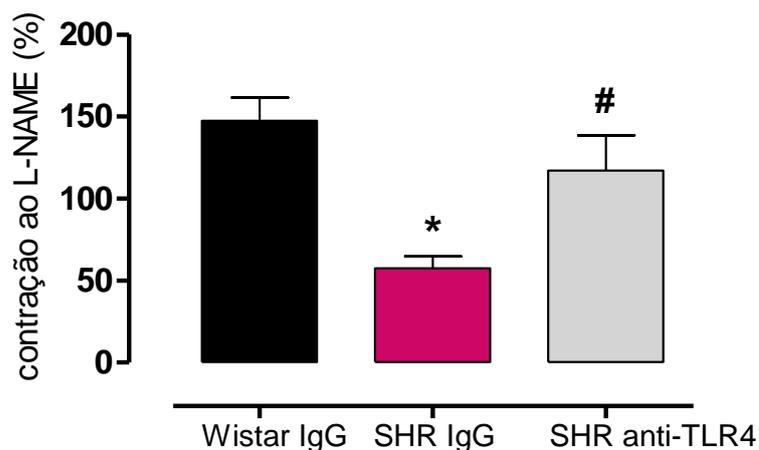


Figura 30 – O tratamento com anti-TLR4 reverte a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico presente em aortas de ratos hipertensos.

Resposta contrátil ao L-NAME (100 μ M) após incubação com fenilefrina (1 μ M) em segmentos de aorta de ratos dos grupos Wistar IgG (n = 5), SHR IgG (n = 5) e SHR anti-TLR4 (n = 6), tratados com 1 μ g anticorpo / dia, durante 14 dias. Resultados expressados em média \pm EPM da porcentagem da contração prévia à fenilefrina (1 μ M). $p^* < 0,05$ vs Wistar IgG, $^{\#}p < 0,05$ vs SHR IgG, ANOVA uma-va e pós-teste de Bonferroni. Número de animais (n) representado entre parênteses.

Em resumo, esses resultados de reatividade vascular nos grupos Wistar e SHR IgG e SHR anti-TLR4 sugerem que o tratamento com anticorpo anti-TLR4 reverte a disfunção endotelial observada em ratos hipertensos. Essa disfunção endotelial dos SHRs está caracterizada por exacerbação da reatividade contrátil à fenilefrina e prejuízo do relaxamento vascular provocado pela acetilcolina, por possível redução da biodisponibilidade de óxido nítrico. Por sua vez, o tratamento por 14 dias com 1 μ M de anti-TLR4 foi capaz de reverter estas alterações, promovendo melhora da função endotelial, muito provavelmente por incrementar a biodisponibilidade de óxido nítrico.

Sendo assim, e considerando que a disfunção endotelial presente na hipertensão arterial está frequentemente associada à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico causada pela produção de EROs, entre outros mecanismos, foram realizados os experimentos com antioxidantes a seguir.

4.2.7 Produção de espécies reativas de oxigênio contribui para o aumento da resposta vasoconstritora em ratos hipertensos

Para investigar os mecanismos responsáveis pelo já mencionado aumento da resposta contrátil à fenilefrina em ratos SHR quando comparada à resposta dos ratos Wistar (Figura 31A), foram desenvolvidas curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta na ausência (curva controle) ou na presença de antioxidantes incubados previamente por 30 minutos, sendo eles: 1 μ M de varredor de ânion superóxido, tiron; 30 μ M de inibidor da NADPH oxidase, apocinina; ou 1000 U/mL de varredor de peróxido de hidrogênio, catalase.

Os ratos Wistar não apresentaram participação de EROs na resposta contrátil à fenilefrina, pois os oxidantes tiron (Figura 31B), apocinina (Figura 31C) e catalase (Figura 31D) não produziram deslocamento da curva concentração-resposta em relação à curva controle.

Já as aortas de ratos SHR IgG demonstraram aumento da produção de EROs na resposta contrátil à fenilefrina, verificada diante do deslocamento da curva para a direita, em todas as condições antioxidantes estudadas: tiron (Figura 31E), apocinina (Figura 31F) e catalase (Figura 31G), em relação à curva controle de animais do mesmo grupo. Isso demonstra que o estresse oxidativo contribui para o aumento da vasoconstrição evocada pela fenilefrina em ratos hipertensos.

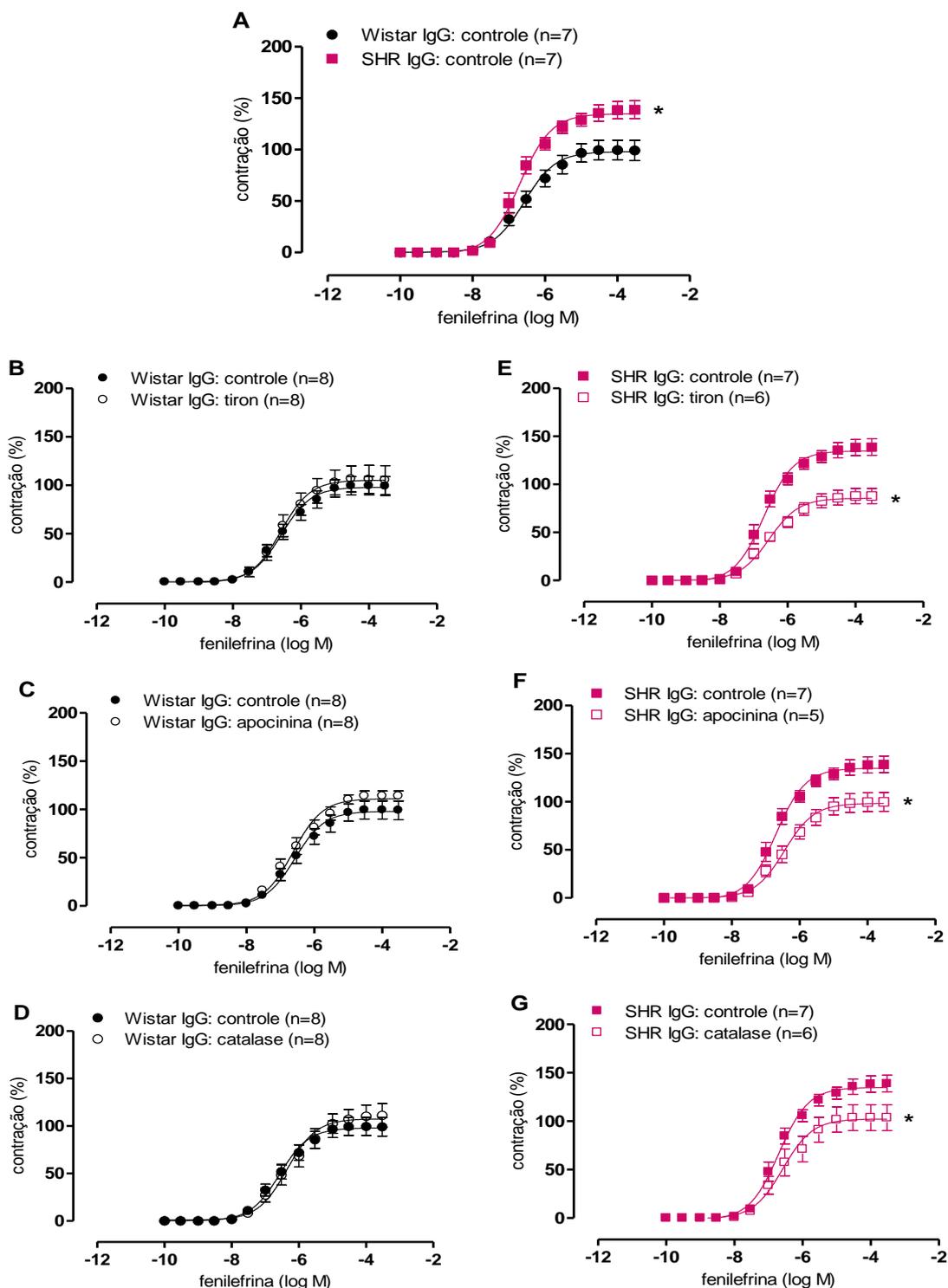


Figura 31 – Produção de EROs contribui para o aumento da resposta vasoconstritora em SHRs.

Curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas em anéis de aorta: comparativas entre Wistar e SHR IgG (A); na ausência (curva controle) ou na presença de tiron (1 μ M), apocinina (10 μ M) ou catalase (1000 U/mL) em ratos Wistar IgG (B, C e D) e em SHR IgG (E, F e G). Resultados expressados em média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs Wistar IgG (A) ou vs curva controle (B-G), ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni (C). Número de animais (n) entre parênteses.

4.2.7.1 Inibição de TLR4 reduz a participação de EROs sobre o aumento da contratilidade vascular de SHRs

Nesta seção foi abordado se as EROs participam dos mecanismos envolvidos na redução da reatividade vascular à fenilefrina diante do tratamento com anti-TLR4 em ratos hipertensos (Figura 32A).

O tratamento com anti-TLR4 foi capaz de abolir o efeito inibitório dos antioxidantes tiron (1 μ M), apocinina (30 μ M) e catalase (1000 U / mL) sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina observada em ratos do grupo SHR IgG (controles do tratamento com anti-TLR4) (Figura 32B-G).

Esses resultados apontam que TLR4 pode provocar aumento do estresse oxidativo vascular, o que contribui para a contratilidade à fenilefrina exacerbada em ratos hipertensos.

As comparações entre pD_2 e R_{max} das curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas na ausência (curva controle) ou presença de tiron, apocinina ou catalase encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas de fenilefrina (0,1 nM – 0,3 mM) de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4, na ausência (controle, ct) ou na presença dos antioxidantes tiron (tir), apocinina (apo) e catalase (cat).

	pD_2			R_{max} (% contração)		
	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4
ct	6,57 \pm 0,08	6,69 \pm 0,12	6,19 \pm 0,09	99,2 \pm 9,8	138,8 \pm 8,6	105,2 \pm 13,4
tiron	6,59 \pm 0,07	6,55 \pm 0,04*	6,47 \pm 0,08	105,3 \pm 14,9	87,8 \pm 7,9*	93,1 \pm 12,8
apo	6,62 \pm 0,04	6,45 \pm 0,16*	6,69 \pm 0,10	113,9 \pm 5,3	99,9 \pm 9,8*	97,8 \pm 13,9
cat	6,35 \pm 0,09	6,58 \pm 0,24*	6,45 \pm 0,08	111,2 \pm 12,4	103,6 \pm 13,4*	100,4 \pm 9,9

Valores expressados como média \pm EPM.

* $p < 0,05$ vs curva controle, ANOVA uma-*via* e pós-teste de Bonferroni.

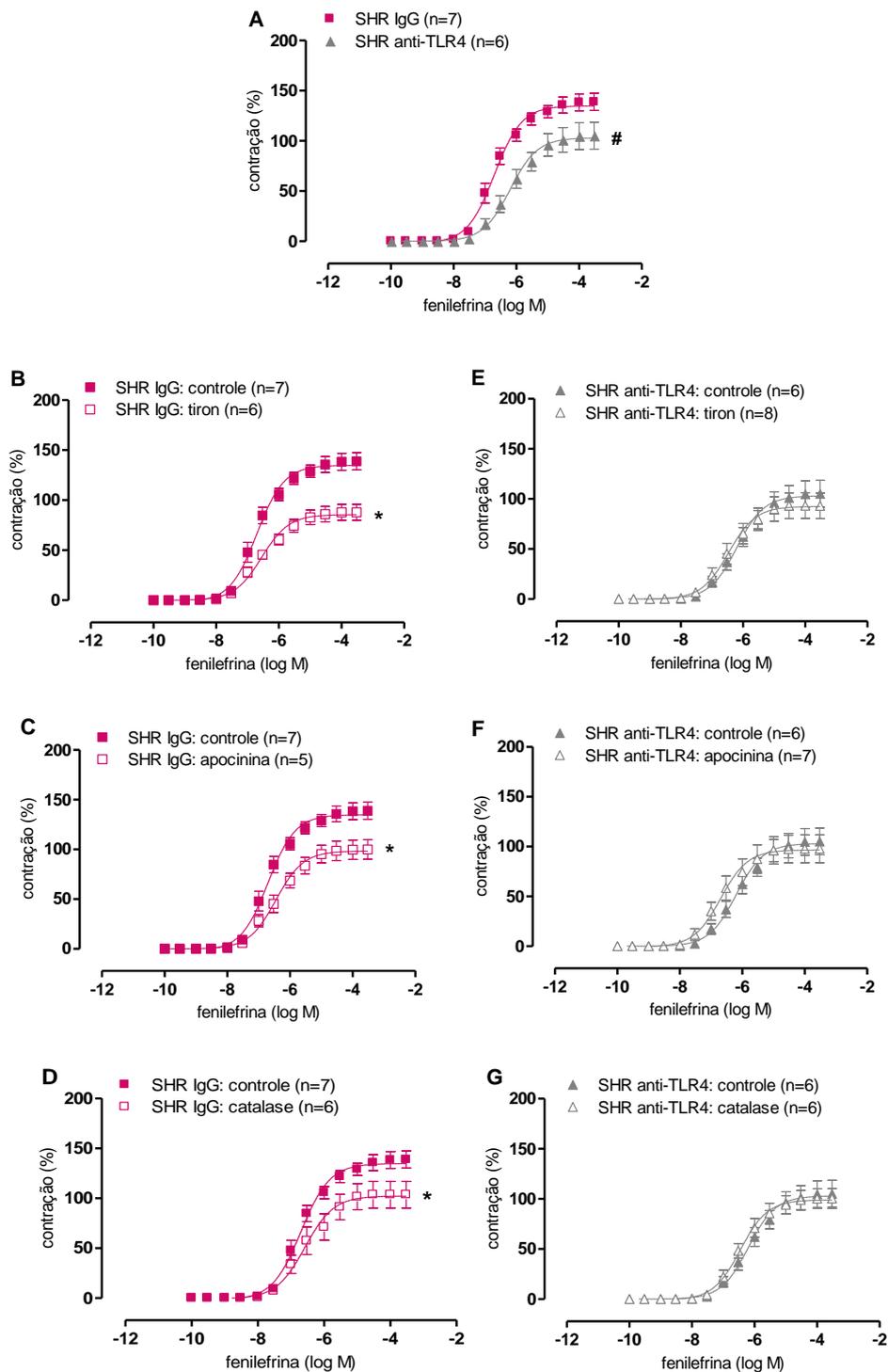


Figura 32 – Inibição de TLR4 reduz o envolvimento do estresse oxidativo sobre o aumento da reatividade vascular à fenilefrina em SHRs

Curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas em anéis de aorta: comparativas entre SHR IgG e anti-TLR4 (A); na ausência (curva controle) ou na presença de tiron (1 μ M), apocinina (10 μ M) ou catalase (1000 U/mL) em ratos SHR IgG (B, C e D) e em SHR anti-TLR4 (E, F e G). Resultados expressados em média \pm EPM. # $p < 0,05$ vs SHR IgG (A); * $p < 0,05$ vs curva controle (B-G), ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni (C). Número de animais (n) entre parênteses.

4.2.8 Prejuízo de vasodilatação em SHRs é influenciado pelo aumento da produção EROs

Em relação à participação das EROs no prejuízo da resposta vasodilatadora em ratos SHR quando comparada à resposta dos ratos Wistar (Figura 33A), foram desenvolvidas curvas concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta na ausência (curva controle) ou na presença de antioxidantes, conforme descrito para a seção anterior.

Do mesmo modo também, os ratos Wistar não apresentaram participação de EROs na resposta vasodilatadora à acetilcolina, como observado pela falta do efeito dos oxidantes tiron (Figura 33B), apocinina (Figura 33C) e catalase (Figura 33D). Ao contrário, nos ratos SHR IgG, foi demonstrado o deslocamento da curva para a esquerda, nas condições antioxidantes avaliadas: tiron (Figura 33E), apocinina (Figura 33F) e catalase (Figura 33G), quando comparadas às respectivas condições controle. Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo vascular contribui para o prejuízo ao relaxamento à acetilcolina observado em ratos hipertensos.

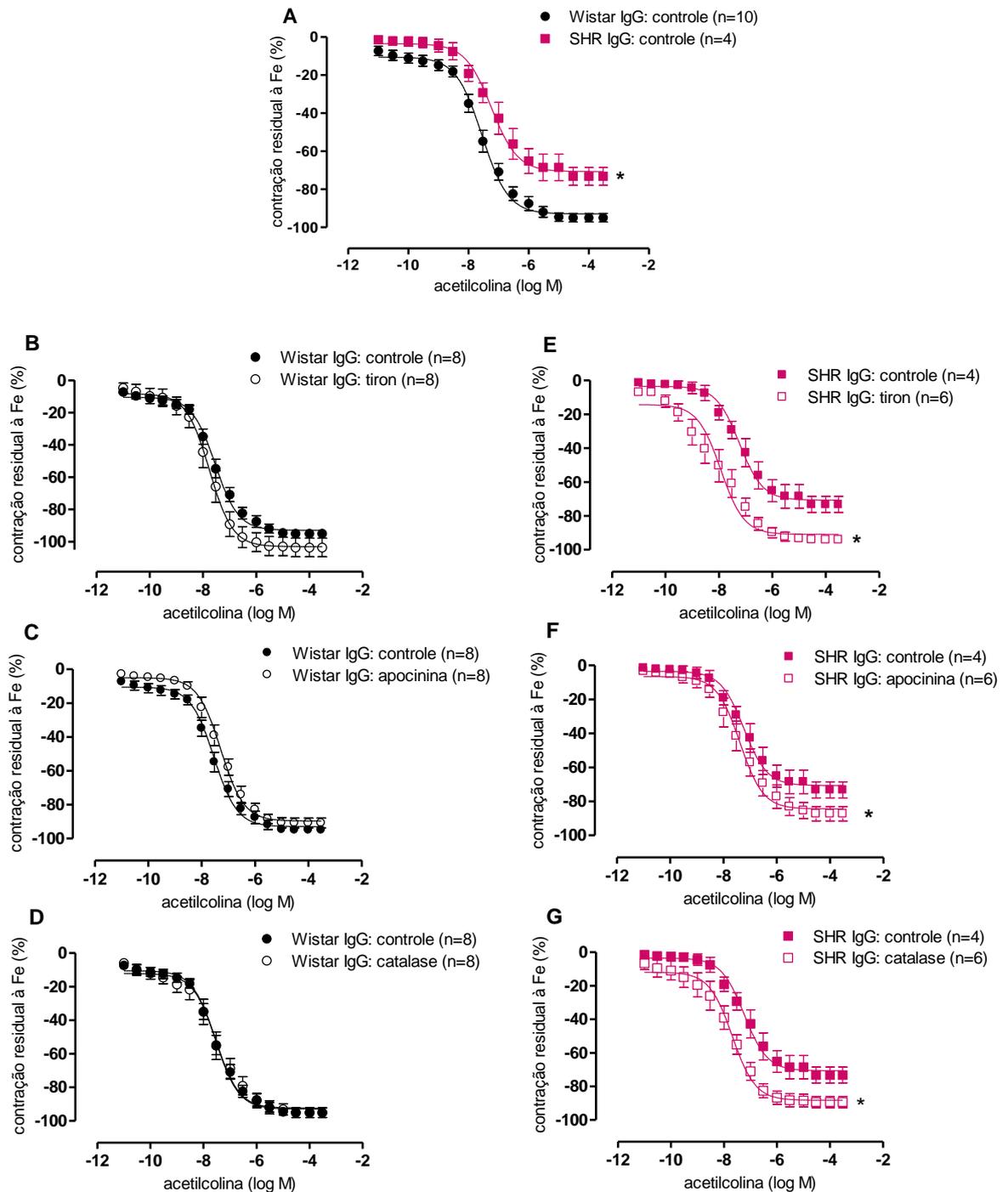


Figura 33 – Prejuízo de vasodilatação em SHRs é influenciado pelo estresse oxidativo vascular.

Curvas concentração-resposta à acetilcolina realizadas em anéis de aorta: comparativas entre Wistar e SHR IgG (A); na ausência (curva controle) ou na presença de tiron (1 μ M), apocinina (10 μ M) ou catalase (1000 U/mL) em ratos Wistar IgG (B, C e D) e em SHR IgG (E, F e G). Resultados expressados em média \pm EPM. $p^* < 0,05$ vs Wistar IgG (A) ou vs curva controle (B-G), ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni (C). Número de animais (n) entre parênteses.

4.2.8.1 Tratamento de ratos hipertensos com anti-TLR4 reverte o prejuízo do relaxamento causado pelo estresse oxidativo vascular.

Nesta seção foi verificada se a redução do estresse oxidativo influencia o maior relaxamento vascular frente à acetilcolina, observada diante do tratamento com anti-TLR4 em ratos hipertensos (Figura 34A).

Foi observado que o tratamento com anti-TLR4 aboliu o efeito dos antioxidantes tiron (1 μM), apocinina (30 μM) e catalase (1000 U / mL) sobre o aumento da resposta vasodilatadora observada em ratos do grupo SHR IgG (Figura 34B-G).

Conforme mencionado, os resultados indicam que o receptor TLR4 está envolvido com maior produção de EROs, o que contribui não somente para o incremento de vasoconstrição à fenilefrina, mas também para o prejuízo do relaxamento dependente de acetilcolina. Essa hipótese é fortalecida diante do tratamento com o anticorpo anti-TLR4, o qual proporciona redução da reatividade vascular à fenilefrina e melhora da vasodilatação frente à acetilcolina em ratos hipertensos.

As comparações entre pD_2 e R_{max} das curvas concentração-resposta à acetilcolina realizadas na ausência (curva controle) ou presença de tiron, apocinina ou catalase encontram-se na Tabela 8.

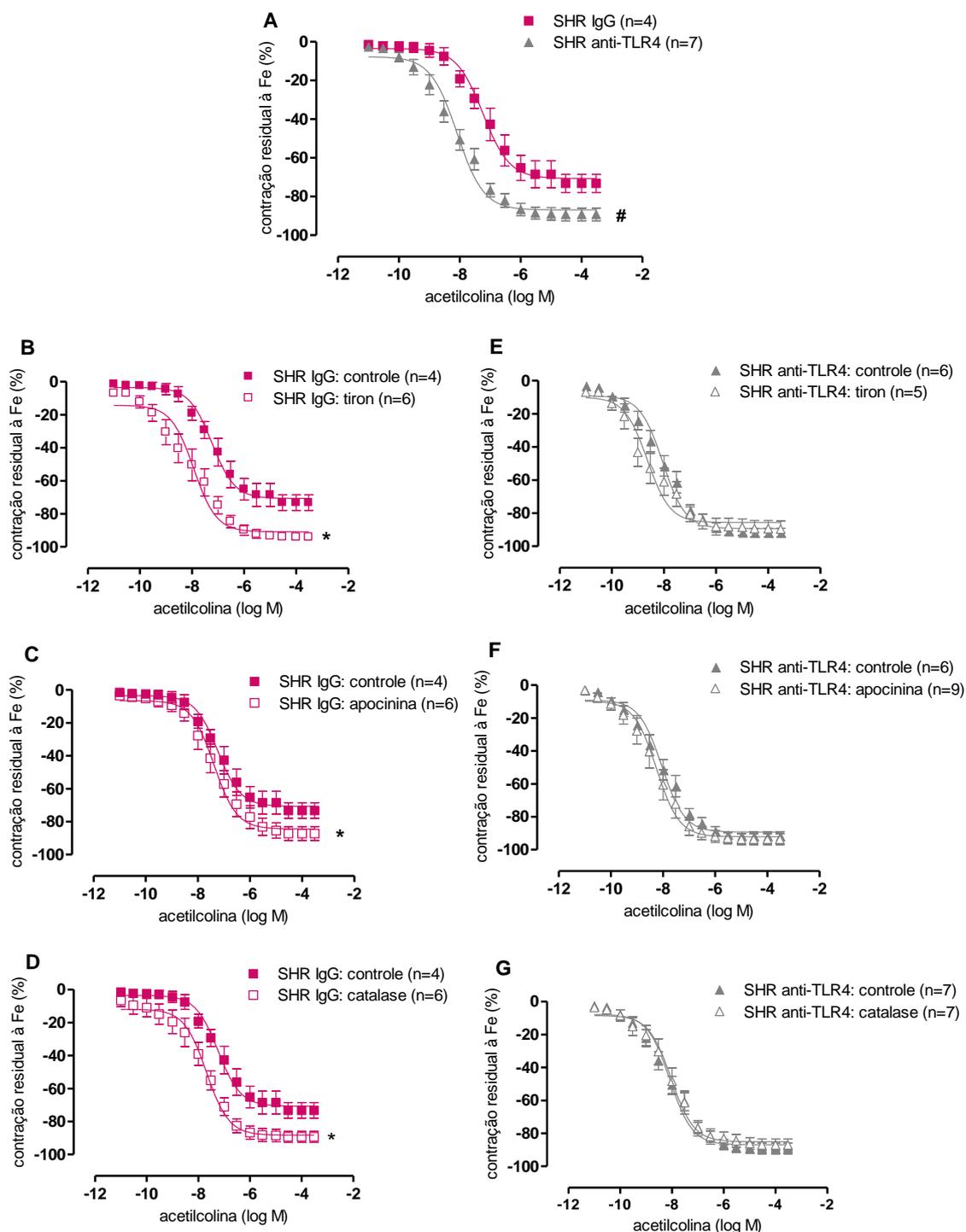


Figura 34 – Tratamento de SHRs com anti-TLR4 reverte o prejuízo do relaxamento causado pelo estresse oxidativo vascular.

Curvas concentração-resposta à acetilcolina realizadas em anéis de aorta: comparativas entre SHR IgG e anti-TLR4 (A); na ausência (curva controle) ou na presença de tiron (1 μ M), apocinina (10 μ M) ou catalase (1000 U/mL) em ratos SHR IgG (B, C e D) e em SHR anti-TLR4 (E, F e G). Resultados expressados em média \pm EPM. # $p < 0,05$ vs SHR IgG (A); * $p < 0,05$ vs curva controle (B-G), ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni (C). Número de animais (n) entre parênteses.

Tabela 8 – Valores de pD_2 e R_{max} obtidos nas curvas de acetilcolina (0,01 nM – 0,3 mM) após contração com uma única dose de fenilefrina (Fe, 1 μ M) de ratos dos grupos Wistar IgG, SHR IgG e SHR anti-TLR4, na ausência (controle, ct) ou na presença dos antioxidantes tiron (tir), apocinina (apo) e catalase (cat).

	pD_2			R_{max} (% contração residual à Fe)		
	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4	Wistar IgG	SHR IgG	SHR anti-TLR4
ct	7,54 \pm 0,09	7,23 \pm 0,13	8,08 \pm 0,10	-94,9 \pm 2,2	-73,2 \pm 4,7	-89,2 \pm 3,3
tiron	7,76 \pm 0,08	7,94 \pm 0,10*	9,94 \pm 0,09	-103,7 \pm 5,8	-94,1 \pm 2,3*	-89,6 \pm 4,9
apo	7,29 \pm 0,10	7,38 \pm 0,14	8,25 \pm 0,14	-90,8 \pm 2,9	-87,2 \pm 4,3*	-93,6 \pm 3,4
cat	7,53 \pm 0,10	7,68 \pm 0,08*	8,03 \pm 0,11	-95,1 \pm 2,9	-89,3 \pm 3,3*	-86,9 \pm 3,5

Valores expressados como média \pm EPM.

* $p < 0,05$ vs curva controle, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

Em resumo, estes resultados sugerem que o aumento da expressão gênica vascular do TLR4 em SHRs contribui para a hipertensão arterial e disfunção vascular, através do estresse oxidativo. Para verificar esses resultados, os seguintes experimentos foram realizados utilizando células cultivadas de músculo liso vascular de aorta de ratos SHR.

4.3 RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE CULTURA DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

4.3.1 Angiotensina II promove incremento da expressão do TLR4 em CMLVs de SHRs através do receptor AT₁

Nesta sequência de experimentos, inicialmente foi feito o *time course* da angiotensina II (100 nM) em diferentes tempos, com quantificação de RNAm de TLR4 através de qRT-PCR, através do qual foi demonstrado que a angiotensina II aumenta a expressão gênica de TLR4 em CMLVs de ratos hipertensos. Isso ocorre nos tempos de 15 e 30 minutos e também de duas horas (Figura 35). Os níveis de RNAm de TLR4 encontrados foram a) 15min: $1,61 \pm 0,17^*$; b) 30 min: $1,84 \pm 0,29^*$; c) 2 horas: $1,78 \pm 0,28^*$; d) 3 horas: $1,37 \pm 0,08$; * $p < 0,05$ vs controle (1), ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

O aumento da expressão de TLR4 diante da incubação por duas horas de 100 nM de angiotensina II aumentou os níveis de TLR4, como acabamos de comentar, e esse efeito foi reduzido pela pré-incubação de uma hora com losartan (1 μ M), o que indica o envolvimento do receptor AT₁ na referida indução (angiotensina II: $1,78 \pm 0,28^*$; angiotensina II + losartan: $0,79 \pm 0,07^{*#}$; * $p < 0,05$ vs controle (1), # $p < 0,05$ vs angiotensina II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni (Figura 36).

Esses resultados confirmam que, efetivamente, a angiotensina II pode promover o incremento da expressão (*upregulation*) do receptor TLR4 em células da musculatura lisa da aorta de ratos hipertensos.

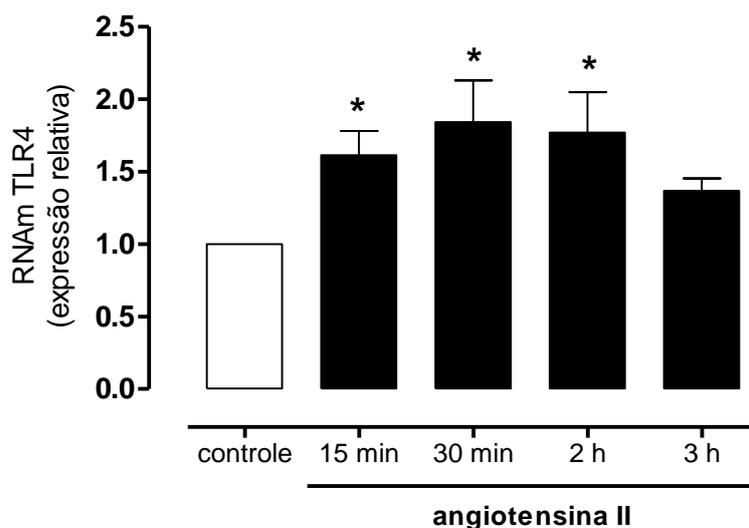


Figura 35 – Angiotensina II promove incremento dos níveis de RNAm do TLR4 em CMLVs de SHRs.

Efeito de 100 nM de angiotensina II nos níveis de RNAm de TLR4 em células de músculo liso vascular de SHRs. Resultados (média \pm EPM) apresentados como expressão relativa comparada ao controle (1). * $p < 0,05$ vs controle, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 4-5).

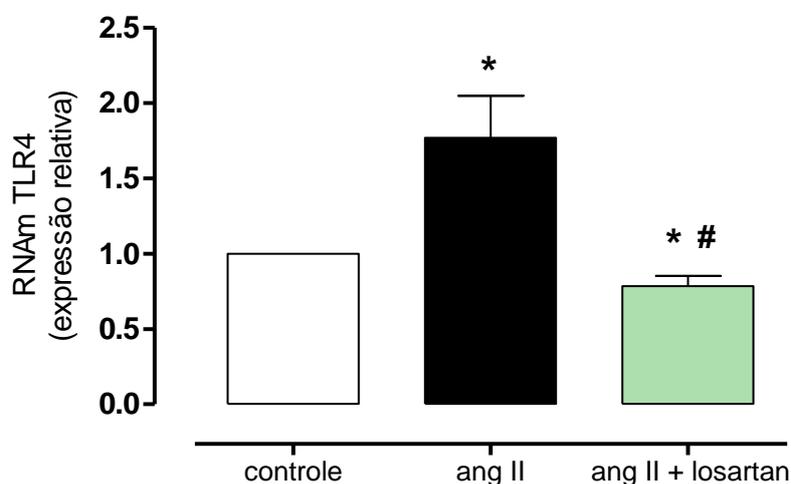


Figura 36 – O incremento de TLR4 causado por angiotensina II em CMLVs de SHRs ocorre através do receptor AT₁.

Efeito de 100 nM de angiotensina II (ang II) por 2 h nos níveis de RNAm de TLR4 em células de músculo liso vascular de SHRs na ausência ou na presença de incubação prévia de 1 h com losartan (10 μ M). Resultados (média \pm EPM) apresentados como expressão relativa comparada ao controle (1). * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ang II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 4-5).

4.3.2 O aumento da expressão gênica de NOX-4 provocado por angiotensina II é reduzido através da inibição de TLR4

Considerando que angiotensina II induz a produção de EROs e, assim, contribui para o processo inflamatório associado à hipertensão (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007; TOUZ & BRIONES, 2011; VIRDIS, DURANTI & TADDEI, 2011), foi investigado se a inibição de TLR4 seria capaz de minimizar este importante efeito da angiotensina II.

Conforme esperado, então, observou-se que a angiotensina II (100 nM, durante 2 horas) aumentou os níveis de RNAm das isoformas da NADPH oxidase NOX-1 e NOX-4. A inibição de TLR4, através da incubação com CLI-095 (1 μ M) uma hora antes do estímulo com angiotensina II foi capaz de reduzir os níveis de RNAm somente de NOX-4. Para NOX-1 os resultados obtidos foram a) angiotensina II: $1,29 \pm 0,03^*$; b) angiotensina II + CLI-095 $1,28 \pm 0,11$, $*p < 0,05$ vs controle (1), teste t de Student; e para NOX-4 foram a) angiotensina II: $1,56 \pm 0,16^*$; b) angiotensina II + CLI-095 $1,21 \pm 0,17^\#$, $*p < 0,05$ vs controle (1), $\#p < 0,05$ vs angiotensina II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni.

A subunidade da NADPH oxidase p22phox, por sua vez, não teve sua expressão gênica aumentada por angiotensina II (angiotensina II: $1,00 \pm 0,11$; angiotensina II + CLI-095: $1,24 \pm 0,13$, $p > 0,05$, ANOVA uma-via). Experimentos também foram realizados com a subunidade NOX-2, entretanto, os resultados foram de difícil detecção (dados não demonstrados). Considerando estes motivos, não foi analisado o efeito do inibidor de TLR4 sobre a expressão das subunidades p22phox e NOX-2.

Esses resultados indicam que o receptor TLR4 participa do aumento da NOX-4 induzido por angiotensina II em CML Vs de ratos hipertensos (Figura 37A-C).

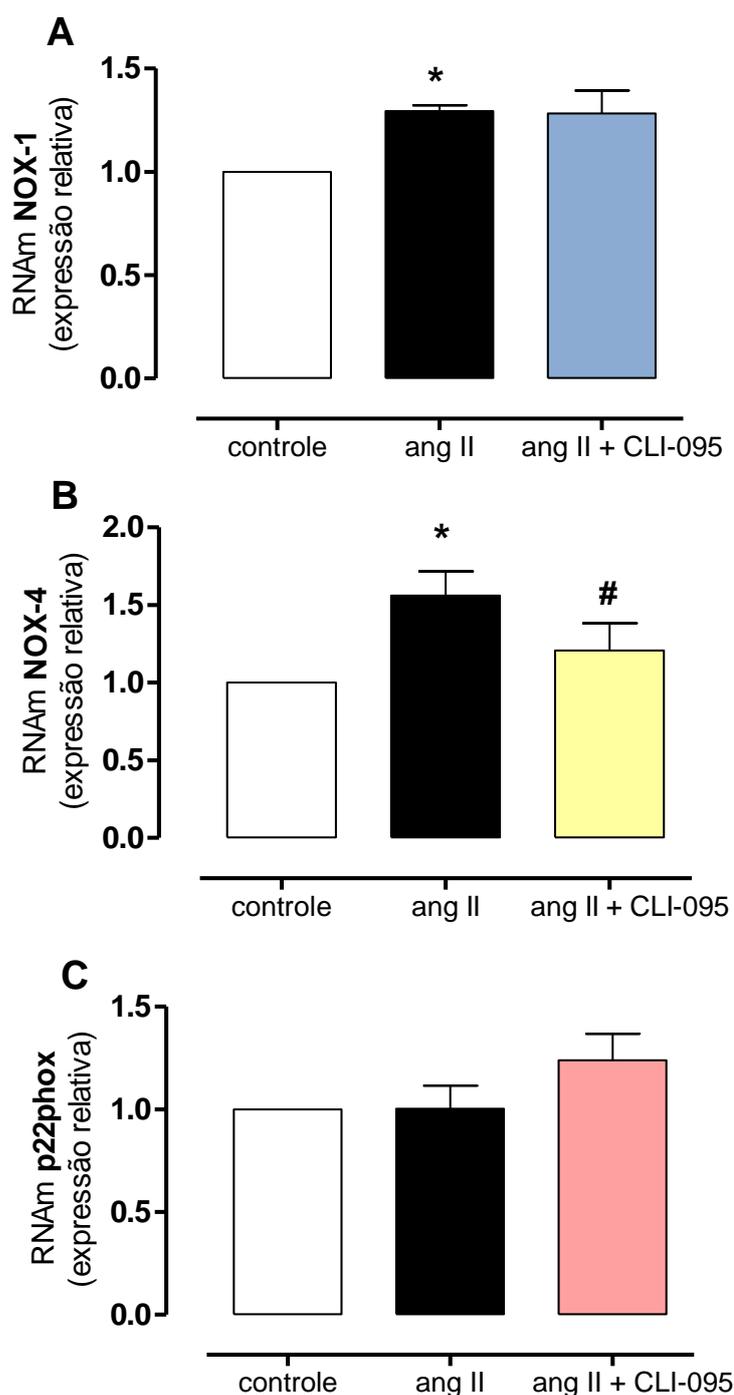


Figura 37 – Inibição de TLR4 reduz o aumento da expressão gênica de NOX-4 provocado por angiotensina II.

Efeitos do inibidor do TLR4, CLI-095 (1 μ M, 1h) sobre a ação de 100 nM de angiotensina II (ang II) por 2 horas nos níveis de RNAm de NOX-1, NOX-4 e p22phox de CMLVs de SHRs. Resultados (média \pm EPM) apresentados como expressão relativa comparada ao controle (1). * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ang II, ANOVA uma-va e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 4-6).

4.3.3 A inibição do receptor TLR4 reduz a atividade da NADP(H) oxidase e a produção de ânions superóxidos induzidos por angiotensina II

Uma vez demonstrado o incremento da expressão de NOX-1 induzida por angiotensina II em ratos SHRs sem a participação do TLR4, e continuando as investigações acerca da influência deste receptor sobre o aumento da produção de EROs pela angiotensina II, foi quantificada a atividade da NADPH oxidase de CMLVs, as quais apresentaram incremento desta atividade enzimática frente ao estímulo com angiotensina II (100 nM, 2 horas). Por sua vez, a inibição do TLR4 feita por CLI-095 (1 μ M) foi capaz de prevenir o efeito causado por angiotensina. Os valores obtidos foram a) angiotensina II: $2,87 \pm 0,61$ URL*; b) angiotensina II + CLI-095: $0,82 \pm 0,33$ URL / mg de proteína#, * $p < 0,05$ vs controle (1), # $p < 0,05$ vs angiotensina II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni (Figura 38).

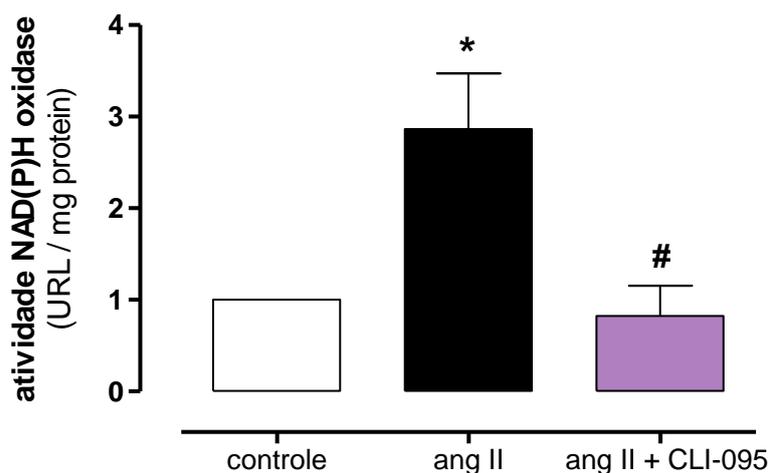


Figura 38 – Inibição do receptor TLR4 reduz a atividade da NADP(H) oxidase estimulada por angiotensina II.

Efeitos do CLI-095 (1 μ M, 1h) sobre a ação de 100 nM de angiotensina II (ang II) por 2 horas na atividade enzimática da NADPH oxidase em CMLVs de SHRs. Resultados (média \pm EPM) expressados como Unidades Relativas de luz (URL) comparada ao controle (1). * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ang II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 5-6).

Neste sentido, foi também mensurada a produção de ânions superóxidos, através da detecção pelo corante oxidativo DHE, com a finalidade de investigar se a influência do TLR4 sobre o aumento da atividade da NADPH oxidase, influenciava,

de fato, a produção de ânions superóxidos nas CMLVs de SHRs estimuladas por angiotensina II.

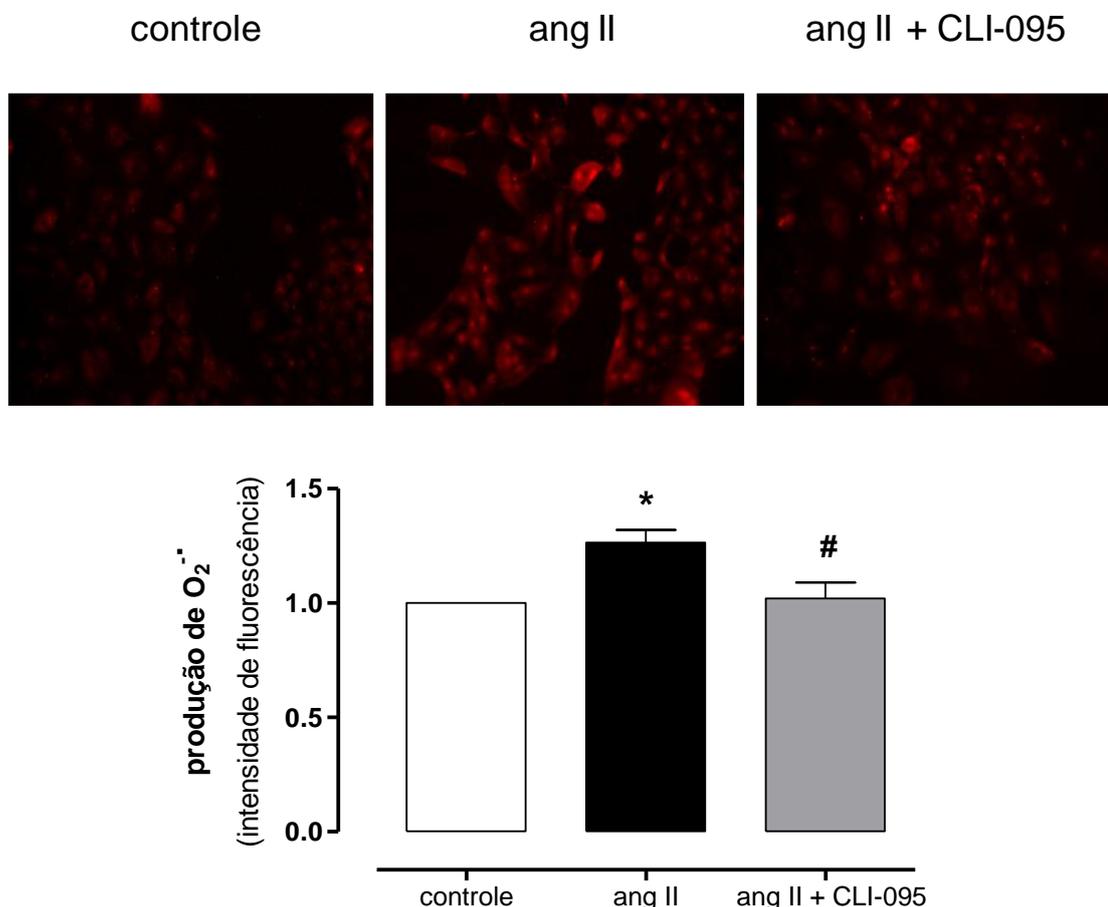


Figura 39 – CLI-095, inibidor de TLR4 reduz a produção de ânions superóxidos aumentada por ação da angiotensina II.

Efeitos do inibidor do TLR4, CLI-095 (1 μ M, 1h) sobre a ação de 100 nM de angiotensina II (ang II) por 2 horas na produção de ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) em CMLVs de SHRs. Na parte superior, encontram-se fotografias representativas que foram capturadas com a ajuda de microscópio de fluorescência. Resultados (média \pm EPM) expressados como intensidade de fluorescência comparada ao controle (1). * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ang II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 6-7).

Como pode ser visualizado na Figura 39, a angiotensina II (100 nM) foi capaz de aumentar a produção de ânions superóxidos e a inibição com CLI-095 (1 μ M) reduziu este efeito, confirmando a hipótese de que o receptor TLR4 está envolvido no incremento de EROs estimulado por angiotensina II em células de músculo liso de aorta de ratos hipertensos.

4.3.4 Aumento da expressão gênica e proteica de COX-2 provocado por angiotensina II é reduzido pela inibição do TLR4

O aumento de prostanóides derivados da COX-2 tem um relevante papel nas alterações vasculares presentes na hipertensão arterial (ALVAREZ *et al.*, 2005; TABERNERO, GIRALDO & VILA, 1999), associado também às evidências de um envolvimento recíproco entre EROs e COX-2 na inflamação vascular característica deste processo patológico (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013). Ademais, Bonfim e colaboradores (2012) descreveram que o tratamento com anti-TLR4 reduziu a expressão proteica de COX-2 em artérias mesentéricas de SHRs.

Desse modo, a enzima COX-2 também foi avaliada neste estudo, com a finalidade de investigar se o TLR4, envolvido na produção de EROs, também participa do aumento da expressão de COX-2 estimulado por angiotensina II em ratos hipertensos. Para isso, também utilizamos o inibidor de TLR4, CLI-095 (1 μ M), uma hora antes da incubação com angiotensina II (100 nM).

De acordo com o esperado, a angiotensina II foi capaz de promover aumento da expressão de RNAm e da expressão proteica da COX-2, avaliados pela técnica de qRT-PCR e Western Blot, respectivamente. CLI-095 foi capaz de reduzir o aumento tanto da expressão de RNAm quanto da expressão proteica de COX-2 em CMLVs de SHRs, sugerindo o envolvimento do TLR4 nesta ação da angiotensina II.

Os valores encontrados para RNAm foram a) angiotensina II: $8,74 \pm 2,28^*$ e b) angiotensina + CLI-095: $2,68 \pm 1,66^\#$, $*p < 0,05$ vs controle (1), $^\#p < 0,05$ vs angiotensina II, teste t de Student. Para expressão proteica, os resultados obtidos foram: a) angiotensina II: $1,40 \pm 0,11^*$ e b) angiotensina + CLI-095: $0,69 \pm 0,11^\#$, $*p < 0,05$ vs controle (1), $^\#p < 0,05$ vs angiotensina II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni (Figura 40A-B).

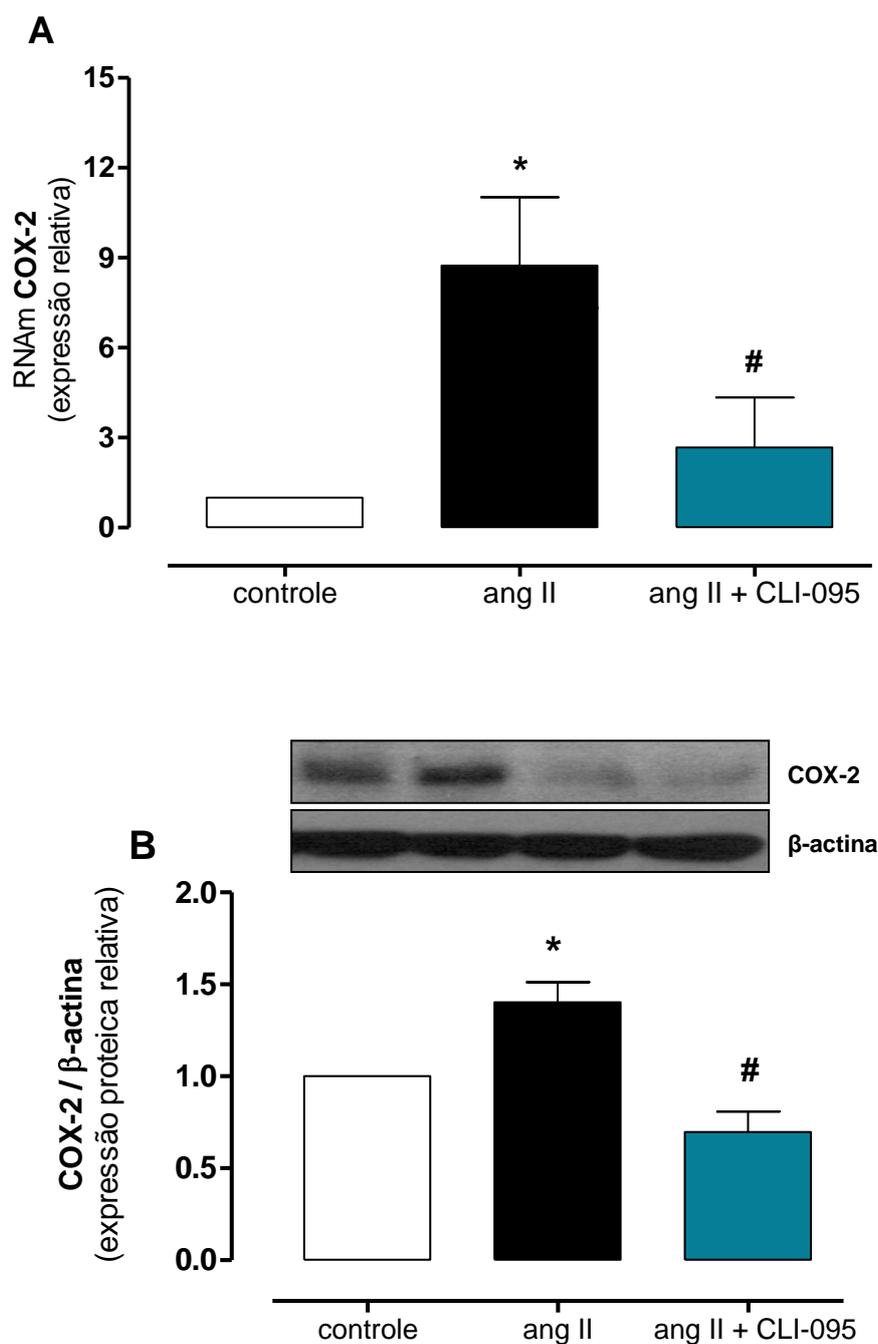


Figura 40 – Expressão gênica e proteica de COX-2 aumentada em SHRs por angiotensina II é reduzida por inibição de TLR4.

Efeitos do inibidor do TLR4, CLI-095 (1 μ M, 1h) sobre a ação de 100 nM de angiotensina II (ang II) por 2 horas na expressão de RNAm (A) e na expressão proteica (B) de COX-2 em CMLVs de SHRs. Resultados (média \pm EPM) apresentados como expressão relativa comparada ao controle (1) para níveis de RNAm (A) e como relação entre COX-2 e β -actina para níveis de proteína (B). * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ang II, ANOVA uma-va e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 6-7).

4.3.5 CLI-095, inibidor de TLR4, reduz o aumento da migração e da proliferação celular induzidos por angiotensina II.

Por fim, CMLVs cultivadas foram utilizadas para investigar se TLR4 participa do aumento da migração e proliferação celular induzidos por angiotensina II em células de ratos hipertensos, uma vez que a capacidade da angiotensina II de provocar esses efeitos já é conhecida (MEHTA & GRIENGLING, 2007).

Para quantificar a migração celular, fotos foram capturadas no tempo zero (0) e, depois, foram comparadas com fotos obtidas 24 horas após o estímulo com angiotensina II (100 nM), na ausência ou presença de incubação por uma hora com o inibidor de TLR4, CLI-095 (1 μ M). Os dados representam a área de fechamento da ferida comparado ao tempo zero de cada tratamento e em relação à situação controle (sem CLI-095 ou angiotensina II), assumida como 1 (um), como pode ser visto nas imagens da Figura 41.

A quantificação da migração celular após 24 horas de angiotensina II foi de $2,77 \pm 0,48$, maior que a situação controle (1) ($p < 0,05$, teste t de Student), como já era esperado. O inibidor CLI-095 foi capaz de reduzir o aumento da migração celular induzido por angiotensina II, sendo observado o valor de $1,27 \pm 0,29$ para a incubação de angiotensina II + CLI-095 ($p < 0,05$, teste t de Student) (Figura 41).

Em relação à proliferação celular de CMLVs de SHRs após incubação com angiotensina II (100 nM, durante 24 horas) na ausência ou presença de CLI-095 (1 μ M), também pode ser observada uma resposta semelhante à encontrada na avaliação da migração celular. Diante do estímulo com angiotensina II houve maior proliferação celular, conforme esperado, o qual foi reduzido pela inibição de TLR4 com CLI-095, sendo encontrados os seguintes resultados: A) angiotensina II: $1,29 \pm 0,04^*$; B) angiotensina II + CLI-095: $1,05 \pm 0,03^\#$, $*p < 0,05$ vs controle (1), $^\#p < 0,05$ vs angiotensina II, teste t de Student (Figura 42).

Vale ressaltar que em CMLVs de ratos hipertensos, o antagonismo provocado por CLI-095 não foi capaz, sozinho, de modificar nenhum dos parâmetros estudados (resultados não demonstrados).

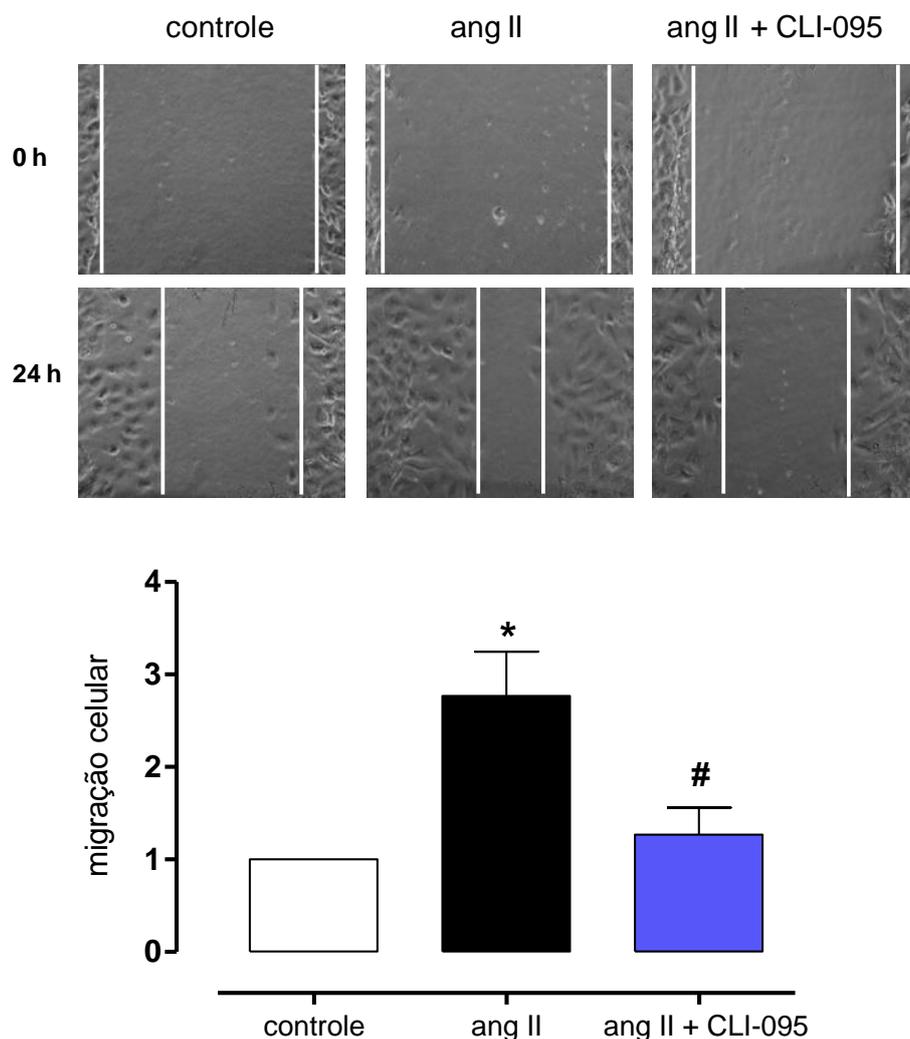


Figura 41 – Migração celular aumentada por angiotensina II é reduzida pela inibição de TLR4.

Efeito da inibição do TLR4 (CLI-095, 1 μ M, 1h) sobre a ação de 100 nM de angiotensina II (ang II) por 24 horas na migração celular de CML Vs de SHRs. Fotos capturadas com auxílio de microscópio invertido, no tempo zero e após 24 horas de estímulo com angiotensina II. Resultados (média \pm EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (1). * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ang II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 5-6).

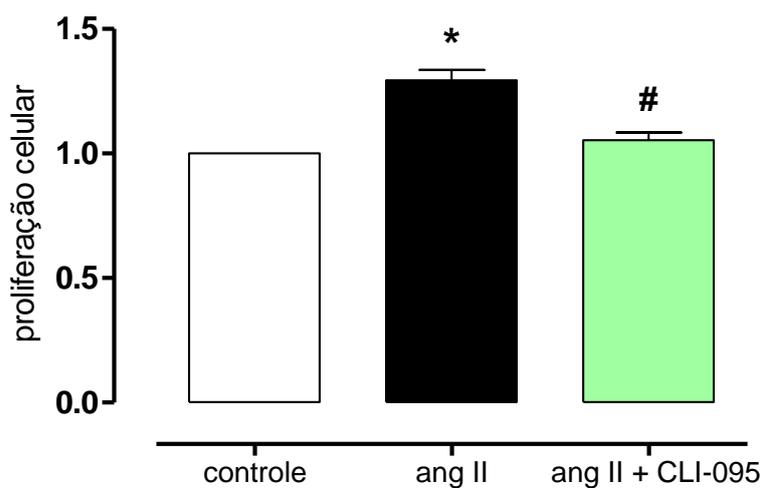


Figura 42 – Aumento da proliferação celular estimulada por angiotensina II é reduzido por CLI-095.

Efeito da inibição do TLR4 (CLI-095, 1 μ M, 1h) sobre a ação de 100 nM de angiotensina II (ang II) por 24 horas na proliferação celular de CML Vs de SHRs. Resultados (média \pm EPM) apresentados como valores relativos comparados ao controle (1). * $p < 0,05$ vs controle, # $p < 0,05$ vs ang II, ANOVA uma-via e pós-teste de Bonferroni. Número de unidades experimentais utilizadas (n = 5-6).

4.4 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo possibilitam sugerir que:

- o receptor TLR4 está mais expressado em segmentos e células de músculo liso de aortas de ratos hipertensos do que de ratos normotensos, e a angiotensina II contribui para este aumento;
- o tratamento de ratos SHR com anticorpo anti-TLR4 foi capaz de: reduzir a pressão arterial e a frequência cardíaca; diminuir a hiperreatividade vascular à fenilefrina, bem como o prejuízo do relaxamento à acetilcolina; restaurar a participação endotelial sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, provavelmente através da maior liberação de óxido nítrico; abolir a participação do estresse oxidativo sobre o aumento de contratilidade vascular, bem como sobre o prejuízo da vasodilatação causados pela hipertensão;
- a angiotensina II promoveu incremento da expressão do TLR4 em CMLVs de SHRs através do receptor AT₁;
- a inibição do TLR4 através de CLI-095 foi capaz de reduzir os seguintes efeitos da angiotensina II em CMLVs de ratos hipertensos: aumento de NOX-4, da atividade da NADPH oxidase e da produção de ânions superóxidos; incremento da expressão gênica e proteica da COX-2; e aumento da proliferação e migração celular.

Em linhas gerais, este estudo sugere que o aumento da expressão do TLR4 causado pelo incremento da atividade do SRA, contribui para a ocorrência da hipertensão e para as alterações vasculares causadas por esta enfermidade. Além disso, este aumento na expressão de TLR4 está também envolvido no estresse oxidativo que, muito provavelmente, contribui para a disfunção endotelial observada na hipertensão.

5 DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é considerada como uma doença inflamatória crônica, de elevada prevalência mundial, além de constituir um preocupante fator de risco para as demais doenças cardiovasculares. Nesse contexto, existem evidências crescentes que demonstram que a ativação do sistema imune está envolvida na patogênese inflamatória da hipertensão (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2006; SCHIFFRIN, 2013; 2014; MC CARTHY *et al.*, 2014; VIRDIS, DELL'AGNELLO & TADDEI, 2014).

Recentemente, estudos têm descrito a importância da participação dos TLRs e, conseqüentemente, da resposta imune, no desenvolvimento de doenças cardiovasculares com componente inflamatório, como aterosclerose (OTSUI *et al.*, 2007), diabetes (DEVARAJ *et al.*, 2008; DASU *et al.*, 2010; XIE, JIN & ZHU, 2014), pré-eclampsia (KIM *et al.*, 2005; PINEDA *et al.*, 2011) e hipertensão arterial (BOMFIM *et al.*, 2012;), embora os mecanismos pelos quais o TLR4 participa deste processo patológico ainda não se encontram bem esclarecidos.

No presente estudo, sugerimos que o aumento da expressão do TLR4 causado pelo incremento da atividade do SRA, contribui para a ocorrência da hipertensão e das alterações vasculares associadas a esta enfermidade, através da participação do estresse oxidativo.

5.1 TLR4 PARTICIPA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL

Para estudar a hipertensão arterial, utilizamos o modelo experimental da cepa de ratos SHR, no qual a pressão arterial apresenta-se na faixa de normalidade até a quarta semana de vida (MULVANY & NIBORG, 1980) e, muito embora não estejam bem estabelecidos na literatura, valores pouco mais altos de pressão arterial são identificados nesta idade, quando comparados aos ratos normotensos. A partir da quarta semana, a pressão arterial do SHR sofre um progressivo incremento observado até a 12^a semana de vida, alcançando níveis de pressão sistólica de aproximadamente 180-200 mmHg, daí esta progressão passa a ocorrer de maneira muito gradual (LIMAS, WESTRUM & LIMAS, 1980). Corroborando estes dados da literatura, os animais SHR controles apresentavam PAS de aproximadamente 197 mmHg, quando comparado aos animais normotensos (Wistar controle), com cerca de 121 mmHg, em torno de 26 semanas de vida.

Ao ser analisado o peso corporal, também encontramos diferença entre os animais normotensos e os hipertensos controles, sendo os SHRs de menor peso que os Wistar, o que também está de acordo com o relato de outros autores que descrevem que o SHR é resistente ao ganho ponderal (CONTRERAS & KING, 1989; ZHANG *et al.*, 1994), muito provavelmente por serem geneticamente suscetíveis a distúrbios nutricionais, lipidêmicos e glicêmicos (AITMAN *et al.*, 1997).

Neste trabalho, optamos pelo uso de animais Wistar como controles normotensos dos SHR, em detrimento do uso de ratos Wistar-Kioto (WKY), utilizados por outros autores, como por exemplo, Eissler e colaboradores (2011). Esta escolha deveu-se ao fato de que ratos WKY podem apresentar alterações metabólicas, vasculite e hipertrofia ventricular, ainda que normotensos (CESARETTI & KOHLMANN JUNIOR, 2006), o que poderia influenciar os resultados obtidos no presente estudo. Vale ressaltar que, em outros trabalhos da literatura, ratos Wistar também foram utilizados como controles dos ratos SHR (IWASE *et al.*, 1998; 2000; BOMFIM *et al.*, 2012).

No presente estudo, observamos que a expressão de TLR4 estava aumentada nas três camadas da parede vascular de segmentos de aorta, bem como na cultura de células musculares lisas de aortas de SHRs quando comparada a de ratos Wistar. Esses resultados são similares ao que foram encontrados em artérias

de resistência de SHRs (BOMFIM *et al.*, 2012) e em cardiomiócitos de SHR adultos e de ratos com hipertensão induzida por L-NAME (EISSLER *et al.*, 2011; SOLLINGER *et al.*, 2014). Em monócitos periféricos de pacientes hipertensos não diabéticos o aumento da expressão do TLR4 também tem sido relatado. Além disso, o tratamento com anti-hipertensivos reduzem a expressão do TLR4 com uma significativa associação com a diminuição da PAS e PAD (MARKETOU *et al.*, 2012). Trabalhos têm demonstrado que a ativação do TLR4 resulta em aumento da sua própria expressão (TAKEDA, KAISHO & AKIRA, 2003; LIEW, LIU & XU, 2005).

Já é conhecido que o receptor TLR4 encontra-se expressado na superfície de diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais e CMLVs, e está envolvido no reconhecimento e resposta frente ao LPS, muito embora existam ligantes endógenos não infecciosos para o TLR4, representados pelos DAMPs, como por exemplo HSP e fibrinogênio, muitos dos quais estão presentes na hipertensão como consequência da morte celular e da lesão celular crônica (TSAN & GAO, 2004; MC CARTHY *et al.*, 2014, SAN & GAO, 2004; KAWAI & AKIRA, 2010). O aumento dos níveis de TLR4 pode explicar o aumento da resposta vascular ao LPS que o nosso grupo identificou previamente em ratos SHR (BRIONES *et al.*, 1999; 2000; HERNANZ *et al.*, 2004). Ligantes do TLR4, como o LPS, associa-se a proteína LPB, formando um complexo que ativa o TLR4, recrutando moléculas adaptadoras que irão deflagrar alguma das duas vias de sinalização do TLR4, e, subsequentemente, mediar uma resposta imune caracterizada pela indução de fatores inflamatórios (BOSSHART & HEINZELMANN, 2007; MICHELSEN *et al.* 2004; YAMAMOTO & TAKEDA, 2010; KAWAI & AKIRA, 2010; WANG *et al.*, 2010). Desse modo, os resultados do presente estudo, associados aos encontrados na literatura, sugerem que a ativação do TLR4 pode contribuir para o mecanismo inflamatório observado na hipertensão arterial.

Diante da maior expressão de TLR4 em ratos SHRs observada em nosso estudo, propomos um tratamento para inibir esse receptor e, assim, tornar possível a avaliação dos efeitos deste tratamento na hipertensão e nas alterações vasculares associadas a este processo patológico. O uso do anticorpo anti-TLR4 vêm sendo testado em algumas condições inflamatórias, como a sepse e a doença intestinal crônica, com resultados promissores que demonstram diminuição do processo inflamatório (DAUBEUF *et al.*, 2007; FORT *et al.*, 2005). Assim, no presente estudo,

hipotetizamos que a redução da ativação do TLR4, usando um anticorpo neutralizante *in vivo*, poderia melhorar a inflamação de baixo grau presente na hipertensão, realizando, desse modo, este tratamento após a instalação da hipertensão arterial de SHRs, entre a 11 e 12ª semana de vida dos animais.

Para controle do tratamento dos ratos do grupo SHR anti-TLR4 foi utilizado o anticorpo IgG inespecífico em SHRs (SHR IgG), bem como em ratos Wistar (Wistar IgG), nosso controle normotenso. Conforme já descrito, o anticorpo IgG não específico foi utilizado como controle por descartar os efeitos inespecíficos do tratamento com o anti-TLR4 (BOMFIM *et al.*, 2012). Os ratos dos grupos SHR, de aproximadamente 11 semanas no início e com cerca de 13 semanas de idade ao final do tratamento, apresentaram peso corporal menor em relação aos ratos Wistar, em ambas as épocas, corroborando nossos dados descritos anteriormente, obtidos em ratos dos grupos SHR e Wistar controle, e também os dados da literatura mencionados (CONTRERAS & KING, 1989; ZHANG *et al.*, 1994). Vale ressaltar que o tratamento com IgG não levou à modificação do peso corporal dos ratos SHR ou Wistar, pois diante da comparação do peso corporal entre ratos da mesma raça dos grupos controle e IgG, não foi identificada diferença estatística. Somado a isso, não observamos diferenças no crescimento ósseo entre os grupos Wistar e SHR, o qual foi estimado pelo comprimento da tíbia aferido nestes animais após decaptação para a realização dos experimentos *in vitro*. O tratamento com anti-TLR4, por sua vez, não modificou os parâmetros peso corporal e crescimento ósseo dos ratos SHR.

Comparando as medidas hemodinâmicas dos ratos dos grupos SHR IgG e Wistar IgG, observamos maiores valores de PAS, PAD e PAM nos SHRs, conforme esperado (LIMAS, WESTRUM & LIMAS, 1980). Além disso, em nosso estudo, os animais hipertensos apresentaram aumento da frequência cardíaca, quando comparados aos normotensos. Sabe-se que fatores que influenciam o DC, como contratilidade miocárdica e volemia, contribuem para a elevação da pressão arterial, bem como fatores que aumentam a RVP, sendo as alterações na resistência vascular umas das principais responsáveis por modificações na pressão arterial (FOLKOW, 1982; LUND-JOHANSEN, 1983; BOHR & WEBB, 1984). Dentre as alterações que podem contribuir para o aumento de RVP, podem ser citadas as modificações vasculares estruturais, mecânicas e funcionais, como por exemplo: remodelamento vascular com diminuição do diâmetro do vaso e aumento da área de

secção transversa da camada média (MULVANY, 2002); aumento da síntese de matriz extracelular, como colágeno e fibronectina; redução da atividade das metaloproteinases, reduzindo a degradação da matriz extracelular na camada média (TOUYZ, 2005); maior redução do relaxamento ou aumento da liberação de fatores vasoconstritores derivados do endotélio; aumento da contração do músculo liso; e aumento da atividade simpática (FOLKOW, 1982; BOHR & WEBB, 1984; BLAUSTEIN, 1988; MARÍN, 1993; LUSCHER & VANHOUTTE, 1996; JOYNER, CHARKOUDIAN & WALLIN, 2010).

A exacerbação da atividade simpática poderia justificar o aumento da PAS (VASSALLO *et al.*, 1998) e da frequência cardíaca observada em nossos animais hipertensos em relação aos normotensos, o que vai de encontro à descrição de outros autores sobre a hiperatividade adrenérgica observada em SHRs (KRAMER & WALDROP, 2001; HUGHES & BUND, 2002; JOYNER, CHARKOUDIAN & WALLIN, 2010). Além disso, o controle simpático do DC, realizado pelos receptores β 1-adrenérgicos, pode estar alterado na hipertensão (FURCHGOTT *et al.*, 1959; CHARNET *et al.*, 1995), levando ao aumento da pressão arterial.

Em nosso estudo, os animais SHR apresentaram maior peso do coração (normalizado pelo comprimento da tíbia), estimando-se, assim, a hipertrofia cardíaca esperada nos animais hipertensos. A hipertensão arterial impõe ao miocárdio sobrecarga mediante o aumento da pós-carga decorrente da elevação da RVP. Isso promove a instalação de diversos mecanismos compensatórios no miócito cardíaco com o intuito de manter a função de bomba cardíaca e reduzir a tensão da parede ventricular (KAITO *et al.*, 1996). Autores relatam a correlação entre hipertrofia cardíaca e disfunção ventricular decorrentes dos elevados níveis pressóricos da hipertensão arterial (BING *et al.*, 1995).

Observamos que o tratamento de SHRs com anticorpo anti-TLR4 durante 14 dias reduziu a pressão arterial, corroborando um estudo recente (BOMFIM *et al.*, 2012). É importante considerar que o tratamento foi iniciado com a hipertensão arterial já estabelecida nos animais SHR, em torno de 11-12 semanas de idade. Um potencial mecanismo que pode ser responsável pela ação do anticorpo sobre o TLR4 é de que este anticorpo estaria bloqueando a interação ligante-receptor, justificando sua regulação de forma negativa. Do mesmo modo que observado em algumas terapias usando anticorpos (CHAN & CARTER, 2010), além do bloqueio, a

ligação do anticorpo ao seu alvo pode agir internalizando os receptores de superfície, diminuindo desta forma, sua expressão e ativação.

Foi observada redução da PAS, PAD e da PAM diante do tratamento com anti-TLR4, possibilitando sugerir que o aumento da expressão do TLR4 contribui com o desenvolvimento / manutenção da hipertensão. De acordo com esses relatos, recentemente foi descrito que L-NAME foi incapaz de induzir a hipertensão em camundongos TLR4^(-/-) (SOLLINGER *et al.*, 2014). Somado a isso, existem evidências em relação ao efeito protetor da inibição dos receptores TLRs em doenças cardiovasculares com características inflamatórias, como infarto do miocárdio, aterosclerose e hipertrofia cardíaca (PASTERKAMP, VAN KEULEN & DE KLEJIN, 2004; FRANTZ, ERTL & BAUERSACHS, 2007; HA *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2007).

Embora não tenha sido objeto de nosso estudo, vale ressaltar que um dos principais mecanismos moleculares envolvido na ativação do TLR4 em doenças não infecciosas inflamatórias é dependente da molécula MyD88 (PICCININI & MIDWOOD, 2010), que envolve a ativação de diversas outras moléculas, dentre elas, MAPk, que por sua vez culminam na fosforilação do NF- κ B (BEUTLER, 2004; TAKEUCHI & AKIRA, 2010). Assim, alguns autores relatam que as MAPk estão aumentadas em modelos de hipertensão, como DOCA-sal e SHR. As enzimas MAPk participam da sinalização intracelular de transdução iniciada por um estímulo extracelular (HOMMES, 2003). A ativação da p38, desencadeada pela ativação do TLR4, leva a produção e ativação de mediadores inflamatórios que iniciam o recrutamento de leucócitos e sua ativação, além de estar relacionado com a modulação da intensidade da resposta contrátil em células do músculo liso vascular (JIN *et al.*, 2011).

No presente estudo, a redução da PAD diante do tratamento com anti-TLR4 foi maior que a redução da PAS, o que pode ser justificado pela presença de fatores determinantes para diminuição da RVP, como a possível redução da atividade simpática, a diminuição de fatores vasoconstritores, como EROs e COX-2, aumento do fator vasodilatador óxido nítrico, fatores observados em nosso trabalho diante da inibição do TLR4, os quais discutiremos a seguir. Sabe-se que o aumento da PAD tem importante relação com o aumento da RVP, enquanto que o aumento na PAS está mais relacionado ao maior DC e rigidez da aorta, refletindo o aumento do

sistema nervoso simpático (VICTOR, 2012). Assim, frente ao tratamento com anti-TLR4, é possível sugerir que fatores que reduzem a RVP e, assim, a PAD, podem se sobrepor aos fatores determinantes do DC e, conseqüentemente, da PAS, observados em nosso trabalho, como a redução da atividade simpática e diminuição da frequência cardíaca.

Conforme mencionado, identificamos que após o uso do anticorpo anti-TLR4 *in vivo*, a frequência cardíaca foi reduzida, e a hipertrofia cardíaca teve tendência a diminuir, sugerindo que os efeitos cardíacos do TLR4 contribuem para a ação hipertensiva desta via. Neste contexto, também tem sido descrito que a ativação do TLR4 no tronco cerebral através de AT₁ contribui para o controle simpatoexcitatório na insuficiência cardíaca (OGAWA *et al.*, 2011). Juntamente a isso, outros pesquisadores demonstraram que o bloqueio do TLR4 cerebral melhora a função cardíaca em ratos com hipertensão induzida por angiotensina II (DANGE *et al.*, 2014).

Diversos relatos descrevem a hipertensão arterial como uma doença de caráter inflamatório, na qual se observa um aumento de DAMPs, como a angiotensina II, HSP60 e 70, PCR e citocinas, as quais contribuem para o processo inflamatório vascular e, conseqüentemente, para a disfunção endotelial presente neste processo patológico (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2006). Essas moléculas, por sua vez, podem ativar ou induzir a expressão dos TLRs no sistema cardiovascular.

5.2 ANGIOTENSINA II INFLUENCIA O AUMENTO DA EXPRESSÃO DO TLR4 EM RATOS HIPERTENSOS

O SRA contribui para alterações vasculares associadas à hipertensão através da atividade inflamatória que é capaz de desencadear na parede vascular, incluindo a produção de citocinas, prostanóides e EROs. A angiotensina II, principal hormônio peptídeo do SRA, leva à disfunção vascular e estimula o processo inflamatório em várias células do corpo, incluindo o tecido vascular e renal, estimulando-as a produzirem citocinas inflamatórias, como PCR, IL-6, VCAM-1 e MCP-1, fatores de crescimento, tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) (BOMFIM *et al.*, 2011) através da ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular, as quais contribuem para a inflamação vascular e, assim, para as desordens cardiovasculares (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007; TOUYZ & BRIONES, 2011; VIRDIS, DURANTI & TADDEI, 2011).

Sabe-se que a angiotensina II é capaz de regular a imunidade adaptativa, atuando diretamente nos linfócitos. Os linfócitos B e T de camundongos expressam os receptores AT₁ da angiotensina e, *in vitro*, a angiotensina II estimula a proliferação de linfócitos (NATARAJ *et al.*, 1999). De modo similar, linfócitos T de camundongo expressam um SRA local, regulando sua ativação, marcadores de recrutamento tissular e produção de TNF- α (HOCH *et al.*, 2009). Neste contexto, em 2010 foi proposto por Marvar e colaboradores um mecanismo estabelecendo a ligação entre inflamação e hipertensão arterial mediadas pela angiotensina II, utilizando camundongos submetidos à lesão da região ântero-ventral do terceiro ventrículo cerebral e infundidos com angiotensina II por duas semanas. Foi observado, então, que a lesão cerebral foi capaz de suprimir os efeitos da angiotensina II, bem como o estresse oxidativo vascular, a ativação de linfócitos T circulantes e sua infiltração vascular, sugerindo que os efeitos da angiotensina II no sistema nervoso central causam uma elevação na pressão arterial, a qual pode estimular linfócitos T e o processo inflamatório vascular (MARVAR *et al.*, 2010).

Autores também têm relatado o envolvimento do SRA, através da angiotensina II, na imunidade inata. A angiotensina II é capaz de induzir a expressão de TLR4, o qual desencadeia a imunidade inata e, subsequentemente, a adaptativa,

em diferentes tipos celulares (WOLF *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2009), incluindo CMLVs (JI *et al.*, 2009a; OTSUI *et al.*, 2007; OWENS *et al.*, 2011). Esse aumento explicaria a potenciação desenvolvida pela angiotensina II da ativação de NF- κ B e da expressão de citocinas induzidas por LPS (WOLF *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2009). Estudos têm descrito que os antagonistas dos receptores AT₁ reduzem a resposta imune inata induzida por LPS em diferentes tecidos (SANCHÉZ-LEMUS *et al.*, 2008; 2009; DASU, RIOSVELASCO & JIALAL, 2009; DASU *et al.*, 2010) e a sinalização dependente de TLR4 em pacientes com doença coronariana (TAKAHASHI *et al.*, 2010), além de também protegerem contra a lesão isquemia-reperfusão do miocárdio através da via de sinalização TLR4 / NF- κ B (YANG *et al.*, 2009).

Nesse contexto, demonstramos inicialmente que o tratamento por 12 semanas com losartan (15 mg / Kg . dia, na água de beber) diminuiu os níveis de RNAm do TLR4 aumentados em segmentos de aorta de SHRs, sugerindo a contribuição da angiotensina II para este efeito, o que foi corroborado quando observamos que em CMLVs de aortas de SHRs a angiotensina II aumentou os níveis de mRNA de TLR4 através dos receptores AT₁. O aumento da expressão do TLR4 pela angiotensina II tem sido um importante mecanismo proposto para explicar o envolvimento deste receptor na hipertensão arterial. Desse modo, autores relatam a capacidade da angiotensina em induzir respostas inflamatórias através da ativação do TLR4 (WOLF *et al.*, 2006; JI *et al.*, 2009; YUEN *et al.*, 2012). Na isquemia do miocárdio, por exemplo, em que ocorre um processo inflamatório, foi constatada que a expressão do TLR4 está aumentada e que o tratamento com valsartan, um bloqueador do receptor da angiotensina com propriedades antiinflamatórias, diminui a expressão daquele receptor, bem como a ativação do mesmo, comprovando que o aumento na expressão do TLR4 está relacionado com a sua ativação por angiotensina II (YANG *et al.*, 2009).

Ji e colaboradores (2009a) relataram pela primeira vez que a angiotensina II induz a resposta inflamatória parcialmente através de mecanismos dependentes de TLR4 nas CMLVs. Esses autores sugeriram que a angiotensina II ativa TLR4 através do receptor AT₁ e subsequente ativação de ERK 1 e 2 em células de músculo liso de artérias (JI *et al.*, 2009a; 2009b). Outro estudo descreve que o bloqueio da angiotensina II através da administração de losartan diminui a resposta imune inata

causada pela lesão renal induzida por ciclosporina, através da redução da expressão proteica de TLR2, entre outros mecanismos (AHN *et al.*, 2007).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, associados aos relatos de que a angiotensina II estimula a resposta inflamatória através da via do TLR4 (WOLF *et al.*, 2006; OTSUI *et al.*, 2007; JI *et al.*, 2009a; 2009b; LV *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009; YUEN *et al.*, 2012), acreditamos que esse receptor seja capaz de participar dos efeitos da angiotensina II na hipertensão arterial, na qual o incremento do SRA promove o aumento de TLR4, que por sua vez pode mediar os efeitos da angiotensina II nesse processo patológico.

5.3 TLR4 CONTRIBUI PARA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL PRESENTE NA HIPERTENSÃO

O modelo experimental de hipertensão arterial utilizado, o SHR, desenvolvido em 1963 (OKAMOTO & AOKI, 1963) apresenta características intrínsecas responsáveis por alterações estruturais, mecânicas e funcionais, prévias ao aumento da pressão arterial, as quais muito possivelmente resultam em aumento da resistência vascular periférica levando ao desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial.

Alterações decorrentes da disfunção endotelial nos processos hipertensivos são multifatoriais e em muitos casos, parecem depender do tipo de hipertensão desenvolvida, de sua duração e do leito vascular estudado. Há controvérsias na literatura em relação ao relaxamento vascular dependente do endotélio na hipertensão arterial, podendo estar diminuído, inalterado ou até mesmo aumentado (LÜSCHER *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 1987; ANGUS & COCKS, 1989; PANZA *et al.*, 1990; MANTELLI *et al.*, 1995; TADDEI *et al.*, 1997; BRIONES *et al.*, 1999).

No presente estudo observamos que aortas de ratos hipertensos apresentaram aumento da resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina, bem como prejuízo à resposta vasodilatadora dependente do endotélio, induzida por acetilcolina, quando comparadas aos animais normotensos. Adicionalmente, diante da remoção mecânica do endotélio, foi identificada menor contração à fenilefrina nos animais SHRs quando comparados aos Wistar, sugerindo menor participação endotelial nos animais hipertensos. Esses resultados estão em concordância com os de outros pesquisadores que relatam que a hipertensão está associada à disfunção endotelial com prejuízo do relaxamento dependente do endotélio e aumento da resposta vasoconstritora (FOLKOW, 1982; BOHR & WEBB, 1984; LÜSCHER & VANHOUTTE, 1986; INTEGAN & SCHIFFRIN, 2000; MULVANY, 2002; 2003).

O endotélio vascular pode ser considerado o maior órgão-alvo da hipertensão arterial (RIZZONI *et al.*, 1996), sendo cada vez mais crescentes as evidências de que a disfunção endotelial está envolvida tanto na gênese quanto no desenvolvimento da hipertensão arterial, podendo ser a causa e / ou a consequência dessa doença. Autores descreveram que na hipertensão arterial ocorre um desequilíbrio entre a produção de fatores endoteliais, de modo que os fatores

vasoconstritores podem ser produzidos em maior magnitude que os vasodilatadores (LUSCHER, RAIJ & VANHOUTTE, 1987; LEE E WEBB, 1992, LUSCHER *et al.*, 1988, BAUTISTA, 2003), o que justifica, em parte, o aumento de pressão arterial obtido nos nossos animais hipertensos. Corroborando esses dados, observamos, no presente estudo, que a menor modulação endotelial identificada em SHRs comparados aos Wistar, pode ocorrer devido à redução da participação do óxido nítrico naqueles animais. Isso porque os ratos do grupo SHR IgG apresentaram maior contração vascular frente ao L-NAME (100 μ M), após pré-contração com fenilefrina (1 μ M), sugerindo uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico em animais hipertensos, o que demonstra que o óxido nítrico é um relevante regulador da resposta contrátil ao agonista α -1 adrenérgico, a fenilefrina em animais normotensos.

O óxido nítrico, formado a partir do metabolismo da L-arginina sob a ação da enzima NOS, é um importante fator relaxante derivado do endotélio, colaborando com a regulação do tônus vascular (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989). Conforme referenciamos inicialmente, uma vez produzido, o óxido nítrico é liberado pelo endotélio e difunde-se para as células do músculo liso vascular, ativando a GCs, levando à diminuição de Ca^{2+} intracelular e consequente vasodilatação (MONCADA & HIGGS, 2006). Em determinadas condições, a NOS pode perder sua capacidade de formar óxido nítrico por remover um elétron da NADPH e doá-lo para moléculas de oxigênio formando ânion superóxido ao invés de óxido nítrico (XIA *et al.*, 1998). A produção de superóxido a partir da eNOS desacoplada, como é chamada a eNOS quando ocorre este fenômeno, é acompanhada de estresse oxidativo, o qual diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico (VASQUEZ-VIVAR *et al.*, 1998). Na hipertensão arterial já foi demonstrado que há desacoplamento da eNOS e que isso colabora com o aumento da geração de EROs em SHR, diminuindo a biodisponibilidade de óxido nítrico e colaborando, desse modo, com a disfunção endotelial observada neste modelo (LI *et al.*, 2006)

Assim, a disfunção endotelial contribui para a manutenção do aumento da resistência vascular e, conseqüentemente, da pressão arterial, favorecendo o processo hipertensivo, podendo também levar ao desenvolvimento de outras complicações vasculares, bem como de processos patológicos associados à hipertensão arterial. No âmbito clínico, é possível sugerir que a avaliação da

disfunção endotelial pode ser um indicador de morbidade e mortalidade nos pacientes com processos patológicos cardiovasculares (HEDNET & SUN, 1997), o que está de acordo com Perticone e colaboradores, que acreditam que a disfunção endotelial é um fator prognóstico para complicações do sistema cardiovascular em pacientes com hipertensão arterial essencial (PERTICONE *et al.*, 2001).

Em relação à participação do TLR4 na disfunção endotelial característica da hipertensão, nossos resultados demonstram que o tratamento com anticorpo anti-TLR4 melhora a resposta vasodilatadora à acetilcolina em SHRs, além de reduzir a resposta vasoconstritora à fenilefrina, conforme também demonstrado por outros autores em artérias mesentéricas de resistência (BOMFIM, *et al.*, 2012). Ademais, o incremento na resposta contrátil à fenilefrina após a remoção mecânica do endotélio foi maior em SHRs tratados com anti-TLR4, quando comparados ao grupo SHR IgG, o que sugere que o tratamento melhora a participação endotelial em ratos hipertensos, restaurando-a nestes animais.

Desse modo, os resultados deste estudo até o momento sugerem que o receptor TLR4 contribui para a disfunção endotelial observada na hipertensão arterial. Uma possível justificativa para esta contribuição deve-se a uma importante consequência da ativação do TLR4, que é o aumento na produção de citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α e a IL-6, através da ativação de fatores de transcrição. Sabe-se que essas citocinas encontram-se elevadas no plasma de animais SHR e em humanos com hipertensão arterial (JASTRZEBSKI *et al.*, 2006), sendo que elas podem levar à redução da produção ou da biodisponibilidade de fatores relaxantes derivados do endotélio, à liberação de fatores contráteis, ao estresse oxidativo e à ativação do SRA, os quais contribuem para maior vasoconstrição, aumento da RVP e, por conseguinte, aumento da pressão arterial (SANZ-ROSA *et al.*, 2005; BAUTISTA *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2008).

Nosso grupo, entre outros, demonstraram previamente que a administração de LPS induz a disfunção endotelial tanto em artérias cerebrais (HERNANZ *et al.*, 2004) quanto periféricas (BRANDES *et al.*, 1999; PLEINER *et al.*, 2002). Além disso, há relato que a administração *in vivo* e *in vitro* de LPS causa disfunção endotelial nas artérias de camundongos *wild-type*, mas não em camundongos com mutação do TLR4 (LIANG *et al.*, 2013). O proposto papel do TLR4 na disfunção endotelial e o aumento observado da expressão de TLR4 já anteriormente descrito podem explicar

o importante prejuízo do relaxamento induzido por bradicina provocado por LPS que foi encontrado em artérias cerebrais médias de ratos hipertensos (HERNANZ *et al.*, 2004).

Conforme mencionado, outro mecanismo que pode ajudar a explicar a disfunção endotelial induzida pela ativação do TLR4 é a redução da contribuição do óxido nítrico nas respostas vasculares. Consequentemente, no presente estudo, o tratamento com anti-TLR4 melhorou o relaxamento dependente do endotélio, o qual é dependente de óxido nítrico no leito vascular da aorta (FREITAS *et al.*, 2003). Além disso, em nosso estudo observamos que a contração induzida por L-NAME foi maior em segmentos de aorta de SHRs após o tratamento com anticorpo anti-TLR4, sugerindo que este tratamento pode aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico.

Outros relatos corroboram a idéia de que o TLR4 poderia contribuir para a disfunção endotelial através da redução da produção de óxido nítrico causada por aumento do estresse oxidativo. Foi demonstrado que, diante da ativação do TLR4, LPS pode produzir EROs, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (ASEHNOUNE *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2006; PACQUELET *et al.*, 2007). As EROs geradas a partir da ativação do TLR4 provêm, principalmente, da NADPH oxidase e da mitocôndria (WEST *et al.*, 2011). Além disso, em células do endotélio microvascular cardíaco, a redução da expressão de eNOS e da produção de óxido nítrico via sinalização de TLR4 tem sido descrita diante de condições de hipóxia / reoxigenação (ZHANG *et al.*, 2011). De acordo com esses dados, foi relatado que em camundongos obesos e diabéticos, portanto, com enfermidades inflamatórias, a ativação do TLR4 aumentava o nível das EROs levando à redução da produção e biodisponibilidade de óxido nítrico (LIANG *et al.*, 2013).

5.4 TRATAMENTO COM ANTI-TLR4 REDUZ O ESTRESSE OXIDATIVO VASCULAR EM RATOS HIPERTENSOS

De acordo com o que já foi mencionado, diversos autores consideram que o aumento do estresse oxidativo é um dos mecanismos mais bem aceitos para explicar a biodisponibilidade de óxido nítrico reduzida e a disfunção endotelial associada, presentes na hipertensão arterial (CAI & HARRISON, 2000; SCHULZ, GORI & MÜNDEL, 2011).

Conforme descrevemos, o relaxamento dependente do endotélio está diminuído na hipertensão, o que pode ocorrer devido a vários processos, dentre eles, o prejuízo da liberação basal de óxido nítrico (DOHI *et al.*, 1990). Entretanto, a síntese e liberação de óxido nítrico podem não estar efetivamente modificadas, mas sua biodisponibilidade pode estar reduzida devido ao aumento da formação de ânions superóxido na hipertensão arterial (SUZUKI *et al.*, 1995), os quais são responsáveis por inativar o óxido nítrico, reduzindo sua ação vasodilatadora, o que potencializa a vasoconstrição (GRYGLEWSKI, PALMER & MONCADA, 1986). O aumento dos ânions superóxido pode, ainda, inibir outras fontes vasodilatadoras dependentes do endotélio, como a prostaglandina I₂ (PGI₂) e o EDHF, contribuindo para o aumento da RVP e conseqüentemente para a hipertensão arterial (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 2006).

O ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila formam o grupo conhecido como espécies reativas de oxigênio, EROs (WANG *et al.*, 2001). Tais radicais livres são capazes de reagir com praticamente todas as moléculas biológicas, incluindo lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e com o óxido nítrico, estando envolvidos na regulação da sinalização, crescimento e proliferação celular, bem como na expansão da matriz extracelular. Os resultados do excesso de EROs no sistema cardiovascular são a injúria celular e a disfunção endotelial (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003).

Neste contexto, observamos em nosso estudo que ratos hipertensos apresentam importante participação de EROs sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, bem como sobre a vasodilatação endotélio-dependente, induzida por acetilcolina, sugerindo um estado de estresse oxidativo vascular destes animais. Na presença dos antioxidantes tiron (1 µM), apocinina (30 µM) ou catalase (1000 U/mL),

observamos que a inibição de ânions superóxido, da NADPH oxidase e do peróxido de hidrogênio, levam à redução da vasoconstrição exacerbada em SHRs, bem como à melhora do relaxamento vascular, prejudicado nestes animais.

O estresse oxidativo é um estado no qual se produz uma alteração entre EROs geradas e sua degradação, produzindo um aumento das mesmas, o que influenciará os distintos processos celulares implicados na patogênese e progressão do dano vascular nas enfermidades cardiovasculares, como a hipertensão arterial. Como mencionado, o mecanismo mais conhecido implica na reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, levando à diminuição dos efeitos vasodilatadores e antiinflamatórios do óxido nítrico, além de levar à formação de peroxinitrito, molécula de alta capacidade oxidante e capaz de inibir enzimas antioxidantes, como a SOD (ANTMAN, DEMETS & LOSCALZO, 2005; DIKALOV, 2011; DRUMMOND *et al.*, 2011; TOUYZ & BRIONES, 2011). As EROs também podem contribuir para a inflamação vascular ao induzir a oxidação de distintas quinases e fosfatases, ao ativar fatores de transcrição redox-sensíveis e ao participarem do aumento da expressão de COX-2, de moléculas de adesão e da migração e proliferação de CMLVs, além de participarem da ativação de metaloproteinases e da produção de proteínas de matriz extracelular, como colágeno (ALVARÉZ *et al.*, 2007; BRIONES *et al.*, 2009; DRUMMOND *et al.*, 2011; MARTÍN *et al.*, 2012).

Associado a isso, existem numerosos trabalhos experimentais e clínicos que demonstram o papel do estresse oxidativo na hipertensão arterial. Nosso grupo tem descrito em modelos animais um incremento na produção vascular e plasmática de EROs, assim como nas respostas vasculares ao peróxido de hidrogênio (ALVARÉZ *et al.*, 2007; BRIONES *et al.*, 2009; GARCÍA-REDONDO *et al.*, 2009a; 2009b). Do mesmo modo, um aumento na produção de EROs e uma diminuição da capacidade antioxidante tem sido detectados no sangue e tecidos e pacientes hipertensos (DIKALOV, 2011; DRUMMOND *et al.*, 2011; TOUYZ & BRIONES, 2011).

Existem evidências indicando que diante da ativação do TLR4, o LPS aumenta a geração de EROs, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, devido ação da NADPH oxidase, e que essas EROs estão envolvidas na ativação de NF- κ B e a subsequente expressão de citocinas inflamatórias (ASEHNOUNE *et al.*, 2004; RYAN *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2006; PACQUELET *et al.*, 2007). No presente estudo, encontramos que os efeitos dos antioxidantes de apocinina, catalase e tiron

na contração e no relaxamento vascular são abolidos frente ao tratamento com anticorpo anti-TLR4, sugerindo que o TLR4 contribui para o aumento da produção de EROs e para a disfunção endotelial observada na hipertensão e que sua inibição reverte este efeitos. Corroborando esses achados, autores relatam que TLR4 tem um papel importante na disfunção endotelial associada à diabetes e à obesidade, através do estresse oxidativo (LIANG *et al.*, 2013). Recentemente foi proposto que o aumento da produção de EROs causado pela liberação de DAMPs em camundongos com hipertensão induzida por L-NAME contribui para alterações vasculares encontradas neste modelo (SOLLINGER *et al.*, 2014).

O aumento da produção de EROs também pode ocorrer diante do incremento do SRA, que exerce ações pró-inflamatórias na parede vascular através do estresse oxidativo, bem como através de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004; PAULETTO & RATTAZZI, 2006).

Considerando nossos achados e de outros pesquisadores de que o incremento da angiotensina II é capaz de promover aumento do TLR4, bem como diversos relatos de que este peptídeo pode estimular a inflamação através dessa via (WOLF *et al.*, 2006; OTSUI *et al.*, 2007; JI *et al.*, 2009a; 2009b; LV *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009; YUEN *et al.*, 2012), realizamos experimentos com CMLVs cultivadas com a finalidade de investigar os possíveis efeitos da angiotensina II em que participa o TLR4.

5.5 ANGIOTENSINA II AUMENTA O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE SHR_s ATRAVÉS DO TLR4

Tem sido largamente demonstrado que angiotensina II induz a produção de EROs e, assim, contribui para o processo inflamatório associado à hipertensão (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007; TOUZ & BRIONES, 2011; VIRDIS, DURANTI & TADDEI, 2011). Deste modo, foi investigado se a inibição de TLR4 seria capaz de minimizar este efeito da angiotensina II.

O SRA desempenha um importante papel no aumento do estresse oxidativo presente na hipertensão (SAVOIA & SCHIFFRIN, 2007; ALVAREZ *et al.*, 2007; Ji *et al.*, 2009; TOUYZ & BRIONES, 2011; MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário para que estas espécies modulem a função vascular, seja por ação direta causada pelo estresse oxidativo ou por ativar vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (SZASZ, 2007; WESELER & BAST, 2010; ZINKEVICH & GUTTERMAN, 2011).

Em nosso estudo, confirmamos que a angiotensina II (100 nM) foi capaz de estimular o aumento da expressão do RNAm das subunidades da enzima NADPH oxidase NOX-1 e NOX-4, ambas expressas tanto em células endoteliais quanto em células musculares lisas, entre outras. Além disso, a atividade da NADPH oxidase, determinada através de quimioluminescência, foi efetivamente aumentada pela angiotensina II, a qual também foi capaz de promover aumento da produção de ânions superóxidos, mensurada através do corante oxidativo DHE. Esses dados sugerem que o aumento da expressão gênica da subunidade NOX-1, bem como a elevada atividade da enzima NADPH oxidase, resultaram, de fato, na maior produção dos ânions superóxidos causada por angiotensina II em CMLVs de animais hipertensos. Como descrito por Drummond e colaboradores (2011), a NOX-1 está envolvida na produção de ânions superóxidos enquanto que a NOX-4 participa da produção de H₂O₂, o que corrobora nossos achados funcionais, em que os animais hipertensos parecem apresentar aumento tanto de ânions superóxidos quanto de H₂O₂.

Estudos realizados na última década contribuíram para esclarecer os mecanismos envolvidos na elevação da produção de EROs pelo SRA. Sabe-se que a angiotensina II é capaz de induzir a expressão da enzima NADPH oxidase, a principal produtora de ânion superóxido nos tecidos vasculares (SEDEEK *et al.*, 2009). O estresse oxidativo desencadeia o início do processo inflamatório por estimular a permeabilidade vascular, através do aumento de mediadores inflamatórios como prostaglandina (LEE *et al.*, 2004). Os estágios seguintes da inflamação, caracterizados pela adesão, migração e quimiotaxia das células inflamatórias na vasculatura, também são determinados pela produção de EROs. A angiotensina II, neste sentido, atua elevando a expressão das moléculas de adesão celular VCAM-1, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, *intercellular cell adhesion molecule-1*) e E-selectina, através das vias de sinalização que envolvem os radicais livres. Tal fenômeno se amplifica com a invasão da parede vascular por células inflamatórias, ricas em NADPH oxidase, intensificando o estresse oxidativo local (BROWN, 2008). Esses relatos vão de encontro ao estado inflamatório vascular caracterizado pelo estresse oxidativo desencadeado por angiotensina II, o qual pôde ser observado no presente estudo em CMLVs de ratos hipertensos.

Situações onde ocorre aumento da produção de EROs, redução da atividade do sistema antioxidante e aumento do estresse oxidativo estão associadas ao desenvolvimento de enfermidades como o câncer, artrites, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (GRIENGLING & FITZGERALD, 2003).

Em CMLVs de ratos hipertensos, identificamos que o inibidor de TLR4, CLI-095 (1 μ M), reduziu o incremento da expressão de NOX-4, da atividade da NADPH oxidase e da produção de ânion superóxido causados por angiotensina II. Esses resultados reforçam a contribuição da ação do TLR4 induzido pelo SRA no estresse oxidativo observado na hipertensão. Alguns autores também têm descrito o papel do TLR4 nos efeitos mediados por angiotensina II através da produção de EROs. Deste modo, após liberação de angiotensina II, a osteocalcina ativa PKC/TLR4/ROS/COX-2, que medeia a transformação de fibroblastos em miofibroblastos (YUEN *et al.*, 2012). Adicionalmente a isso, o estresse oxidativo mediado por TLR4 / MyD88 está envolvido na apoptose de células mesangiais induzida por angiotensina II (LV *et al.*, 2009). Recentemente, Liang e colaboradores (2013) descreveram que camundongos diabéticos com mutação no gen do TLR4 apresentam efeito protetor

frente à disfunção endotelial através da redução das isoformas NOX-1 e NOX-4 da NADPH oxidase, sugerindo um papel do TLR4 na contribuição da disfunção endotelial através do incremento do estresse oxidativo.

Com base nesses relatos, juntamente com nossos achados de que a inibição do TLR4 promoveu redução da expressão de NOX-4, da atividade da NADPH oxidase e da produção de ânions superóxidos provocados por angiotensina II, nossos resultados sugerem que o TLR4 participa do aumento do estresse oxidativo provocado por este peptídeo em CMLVs de SHRs.

5.6 TLR4 PARTICIPA DO AUMENTO DA EXPRESSÃO DE COX-2 INDUZIDO POR ANGIOTENSINA II EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE SHR_s

O aumento de prostanóides derivados da COX-2 tem um relevante papel nas alterações vasculares presentes na hipertensão arterial (ALVAREZ *et al.*, 2005; TABERNERO, GIRALDO & VILA, 1999), associado também às evidências de um envolvimento recíproco entre EROs e COX-2 na inflamação vascular característica deste processo patológico (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

Observamos no presente estudo que a angiotensina II foi capaz de aumentar tanto a expressão gênica quanto a expressão de COX-2 em CMLVs de SHR_s. Acredita-se que o incremento na atividade do SRA e nos níveis de citocinas inflamatórias diante da hipertensão arterial poderia estar implicado na indução de enzimas geradoras de prostanóides em nível vascular. Assim, tanto a angiotensina II quanto a IL-1 β induzem a expressão de COX-2 em CMLVs (OHNAKA *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2002; ALVAREZ *et al.*, 2007; JIA *et al.*, 2008; WANG & FITZGERALD, *et al.*, 2010; CAMACHO *et al.*, 2011) e em células endoteliais (CASOS *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2011). A angiotensina pode potencializar a expressão de COX-2 pela estabilização do RNAm desta enzima por mecanismos dependentes da ativação da MAPk p38 (GALÁN *et al.*, 2011).

O incremento na síntese de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2 está associado à hipertensão arterial podendo, também, ser responsável pelo prejuízo no relaxamento dependente do endotélio (VANHOUTTE & BOULANGER 1995, TADDEI *et al.*, 1997). Esse aumento na produção de prostanóides vasoconstritores pode ser atribuído ao aumento na expressão da COX-1 e COX-2 (GE *et al.*, 1995; HENRION *et al.*, 1997). Além disso, pode ocorrer aumento na sensibilidade aos prostanóides vasoconstritores devido ao aumento na sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca²⁺ (UNGVARI & KOLLER, 2000).

Como muitos dos estímulos e das vias de sinalização intracelular que provocam a liberação de COX-2 e ROS são comuns em diversos casos, autores descrevem uma relação recíproca entre ambos os mediadores (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013). Neste sentido, a própria atividade da COX-2 constitui uma fonte de ânion superóxido devido à sua capacidade de oxidar substâncias, como a NADPH (FÉLÉTOU, HUANG & VANHOUTTE, 2011) e alguns prostanóides podem

aumentar a produção de ânion superóxido em artérias de animais hipertensos (GARCIA-REDONDO *et al.*, 2009b; TANG *et al.*, 2007). Além disso, Martínez-Revelles e colaboradores (2013) descrevem esta relação recíproca sugerindo que através dela ocorra uma ligação entre angiotensina II, disfunção vascular e hipertensão.

Recentemente, Bonfim e colaboradores (2012) descreveram que o tratamento com anti-TLR4 reduziu a expressão proteica de COX-2 em artérias mesentéricas de SHRs. Corroborando este achado, observamos em nosso estudo que o aumento de expressão de RNAm e de expressão proteica de COX-2, neste caso, provocado pelo incremento da angiotensina II (100 nM), foi reduzido através do inibição do TLR4 com CLI-095 (1 μ M), sugerindo a participação do TLR4 neste efeito da angiotensina II em CMLVs de ratos hipertensos.

Sabe-se que um dos produtos da sinalização do TLR4 é a COX-2. Neste sentido, tem sido demonstrado que o LPS aumenta a expressão da COX-2 em células da medula renal através da ativação de TLR4 (KUPER, BECK & NEUHOFER, 2012). Foi também descrito que a angiotensina II induz a liberação de prostanoídes em cultura de macrófagos e de CMLVs (JI *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2007).

Em conjunto, os resultados do presente estudo, de que o TLR4 participa do efeito da angiotensina II de potencializar a COX-2 em CMLVs de ratos hipertensos, somado, sobretudo, ao conhecimento gerado nas outras pesquisas referenciadas, podem sugerir que o TLR4 apresenta uma importante participação nas alterações vasculares associadas à hipertensão por um mecanismo inflamatório dependente de COX-2 e angiotensina II.

5.7 TLR4 CONTRIBUI PARA AUMENTO DA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO CELULAR PROVOCADO POR ANGIOTENSINA II

A capacidade da angiotensina II de provocar migração e proliferação celular já é conhecida (KELLY *et al.*, 2004; MEHTA & GRIENGLING, 2007), o que corrobora com os achados do presente estudo, em que observamos que a incubação com angiotensina II (100 nM) por 24 horas leva à migração celular e também à proliferação das células do músculo liso de aorta de animais hipertensos, após cultura celular.

Pra compreensão desses dois fenômenos, a proliferação celular será descrita associada ao processo de migração celular. De modo geral, é possível considerar que, após uma injúria vascular, o processo inicia-se com desnudação da camada endotelial, apoptose e morte celular na camada média, seguido por proliferação importante nesta camada aproximadamente 24 horas após a injúria. Este processo é mediado por fatores de crescimento e citocinas liberados por plaquetas, células endoteliais ativadas e macrófagos, tais como a PDGF, TGF- β e a angiotensina II (GIBBONS & DAZU, 1994; O'BRIEN, DEBLOIS & SCHWARTZ, 1995). Em seguida, começa a migração de células musculares lisas da camada média através da lâmina elástica interna para a camada endotelial, aonde começa o processo de proliferação celular que dura de uma semana a meses, seguido de síntese e proliferação de matriz extracelular pelas células musculares lisas. As células musculares lisas da camada média que migram para a camada endotelial são caracterizadas como células imaturas ou células que não têm fenótipo muscular, as quais adquirem características fenotípicas de células musculares e miofibroblastos quando atingem o endotélio (ZALEWSKY & SHI, 1997; FAGGIN *et al.*, 1999; O'BRIEN *et al.*, 1998).

Autores relatam que a indução da proliferação celular provocada por angiotensina II leva a alterações estruturais que contribuem para a progressão de diversas doenças vasculares, incluindo a hipertensão (MEHTA & GRIENGLING, 2007). Somado a isso, foi descrito que a angiotensina II em associação com mediadores inflamatórios como INF- γ e TNF- α são capazes de estimular o crescimento e a proliferação das CMLVs contribuindo para a hipertrofia vascular característica da hipertensão arterial (VIRDIS & SCHIFFRIN, 2003).

Adicionalmente, em nosso estudo, observamos que após incubação prévia com CLI-095 (1 μ M), houve redução no aumento da migração e proliferação celular induzidos por angiotensina II (100 nM, 24 horas), o que indica que o TLR4 também participa das ações deste peptídeo nesses mecanismos. Em consonância com estes resultados, já foi demonstrado que a migração de fibroblastos adventiciais de ratos induzida pela angiotensina II é mediada pela ativação do TLR4 (YUEN *et al.*, 2012). Além disso, o TLR4 contribui para o aumento da proliferação e migração celular induzido por outros estímulos (DE GRAAF *et al.*, 2006; PI *et al.*, 2013).

Diante do exposto na literatura, juntamente à nossa observação de que o aumento da proliferação e migração celular induzidos por angiotensina II foi revertido pela inibição do receptor TLR4, sugerimos que a expressão do TLR4 aumentada está associada funcionalmente com alterações estruturais que podem também contribuir para o processo hipertensivo.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstra, pela primeira vez, que o aumento da atividade do SRA observado na hipertensão estimula a via do TLR4, contribuindo para a ocorrência do aumento da pressão arterial. Além disso, através da indução do estresse oxidativo, o TLR4 leva à disfunção endotelial, que é característica deste processo patológico.

Recentemente, diversos estudos têm demonstrado o papel da imunidade adaptativa na patogênese da hipertensão (SCHIFFRIN, 2013; 2014). Entretanto, nossos resultados também sugerem o impacto da resposta imune inata, através da via de sinalização do TLR4, no desenvolvimento deste processo patológico inflamatório e de suas alterações vasculares associadas.

No entanto, novas investigações que analisem profundamente o papel da imunidade inata na hipertensão e nas respectivas lesões em órgãos-alvo podem auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta doença global de alta prevalência.

7 REFERÊNCIAS

ADEAGBO, A.S. *et al.* Cyclo-oxygenase-2 endothelium and aortic reactivity during de oxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. **Journal of Hypertension**. v. 23, n. 5, p. 1025-1036, 2005.

AGUADO, A. *et al.* Mercury induces proliferation and reduces cell size in vascular smooth muscle cells through MAPK, oxidative stress and cyclooxygenase-2 pathways. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 268, n. 2, p. 188-200, 2013.

AHN, K.O. *et al.* Influence of angiotensin II on expression of toll-like receptor 2 and maturation of dendritic cells in chronic cyclosporine nephropathy. **Transplantation**. v. 83, n. 7, p. 938-947, 2007.

AITMAN, T.J. *et al.* Quantitative trait loci for cellular defects in glucose and fatty acid metabolism in hypertensive rats. **Nature Genetics**. v. 16, n. 2, p. 197-201, 1997.

AKIRA, S.; HOSHINO, K. Myeloid differentiation factor 88-dependent and independent pathways in toll-like receptor signaling. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 187, suppl. 2. S356-S363, 2003.

ALVAREZ, Y. *et al.* Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 321, n. 1, p. 381-388, 2007.

ALVAREZ, Y. *et al.* Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of Hypertension**. v. 23, n. 4, p. 767-777, 2005.

ALVAREZ, Y. *et al.* Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 321, n. 1, p. 381-388, 2007.

ANGELI, Jhuli Keli. **Exposição aguda ao cádmio induz lesão endotelial em aorta de ratos**: papel do estresse oxidativo, da angiotensina II e dos prostanóides da via da ciclooxigenase. 2013. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

ANGUS, J.A.; COCKS, T.M. Endothelium-derived relaxing factor. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 41, n. 1-2, p. 303-351, 1989.

ANTMAN, E.M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**. v. 112, n. 5, p. 759-770, 2005.

ASEHNOUNE, K. *et al.* Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF- κ B. **Journal of Immunology**. v. 172, n. 4, p. 2522-2529, 2004.

BADER, M.; *et al.* Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **Journal of Molecular Medicine**. v. 79, n. 2-3, p. 76-102, 2001.

BAKRIS, G.L.; MENSAH, G.A. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. **Cardiology Clinics**. v. 20, n. 2, p. 195-206, 2002.

BARADARAN, A.; NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of Research in Medical Sciences**. v. 19, n. 4, p. 358-367, 2014.

BARHOUMI, T. *et al.* T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. **Hypertension**. v. 57, n. 3, p. 469-476, 2011.

BAUTISTA, L.E. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. **Journal of Human Hypertension**. v. 17, n. 4, p. 223-230, 2003.

BAUTISTA, L.E., *et al.* Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? **Hypertension**. v. 19, n. 5, p. 857-861, 2001.

BAUTISTA, L.E., *et al.* Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. **Journal of Human Hypertension**. v. 19, n. 2, p. 149-154, 2005.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**. v. 87, n. 1, p. 245-313; 2007.

BELTRÁN, A.E., *et al.* MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. **Journal of Hypertension**. v. 27, n. 1, p. 142-154, 2009.

BERECEK, K.H.; RASCHER, W.; GROSS, F. . Vascular reactivity in the pathogenesis of spontaneous hypertension. **Clinical Science**. v. 57, suppl 5. 51s-53s, 1979.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**. v. 430, n. 6996, p. 257-63, 2004.

BHAGAT, K.; VALLANCE, P. Inflammatory cytokines impair endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. **Circulation**. v. 96, n. 9, p. 3042-3047, 1997.

BING, O.H. *et al.* The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 27, n. 1, p. 383-396, 1995.

BLAUSTEIN, M.P. Sodium / Calcium exchange and the control of contractility in cardiac muscle and vascular smooth muscle. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 12, suppl 5. S56-S68, 1988.

BLAUSTEIN, M.P.; HAMLIN, J.M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na⁺ pump, the Na⁺/Ca²⁺ exchanger and TRPC proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, n. 12, p. 1219-1229, 2010.

BOHLEN, H.G. Localization of vascular resistance changes during hypertension. **Hypertension**. v. 8, n. 3, p. 181-183, 1986.

BOHR, D.F. Reactivity of vascular smooth muscle from normal and hypertensive rats: effect of several cations. **Federation Proceedings**. v. 33, n. 2, p. 127-32, 1974.

BOHR, D.F.; WEBB, R.C. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. **The American Journal of Medicine**. v. 77, n. 4A, p. 3-16, 1984.

BOMFIM, G.F. *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**. v. 122, n. 11, p. 535-543, 2012.

BOMFIM, G.F. *et al.* The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. **Endocrinology and Metabolic Syndrome**. suppl 8, p. 1-8, 2011.

BOSSHART, H.; HEINZELMANN, M. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. **Annals of the New York Academy of Sciences**. n. 1096, p. 1-17, 2007.

BRANDES, R.P. *et al.* Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. **Hypertension**. v. 33, n. 5, p. 1243-1249, 1999.

Briones, A.M. *et al.* Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. **Hypertension**. v. 54, n. 1, p. 142-149, 2009.

BRIONES, A.M. *et al.* Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 39, n. 3, p. 378-388, 2002.

BRIONES, A.M. *et al.* Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. **British Journal of Pharmacology**. v. 131, n. 2, p. 185-194, 2000.

BRIONES, A.M. *et al.* Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 126, n. 1, p. 111-120, 1999.

BROWN, N.J. Aldosterone and vascular inflammation. **Hypertension**. v. 51, n. 2, p. 161-167, 2008.

BULBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacological Reviews**. v. 39, n. 1, p. 49-96, 1987.

BUÑAG, R.D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. **Journal of Applied Physiology**. v. 34, n. 2, p. 279-282, 1973.

CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**. v. 68, n. 1, p. 26-36, 2005.

CAI, H.; GRIENGLING, K.K.; HARRISON, D.G. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 24, n. 9, p. 471-8, 2003.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**. v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

CAMACHO, M. *et al.* Hypoxia upregulates PGI-synthase and increases PGI₂ release in human vascular cells exposed to inflammatory stimuli. **Journal of Lipid Research**. v. 52, n. 4, p. 720-731, 2011.

CARVALHO, M.H. *et al.* Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **Journal of Hypertension**. v. 5, n. 3, p. 377-82. 1987.

CASÓS, K. *et al.* Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. **Microvascular Research**. v. 81, n. 3, p. 261-268, 2011.

CESARETTI, M.L.; KOHLMANN JUNIOR O. Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.

CHAN, A.C.; CARTER, P.J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. **Nature reviews. Immunology**. v. 10, n. 5, p. 301-316, 2010.

CHANDRASEKHARAN, N.V. *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

CHARNET, P. *et al.* cAMP-dependent phosphorylation of the cardiac L-type Ca channel: a missing link? **Biochimie**. v. 77, n. 12, p. 957-962, 1995.

CHECK, J. *et al.* Src kinase participates in LPS-induced activation of NADPH oxidase. **Molecular Immunology**. v. 47, n. 4, p. 756-762, 2010.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**. v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CHONG, A.J. *et al.* Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**. v. 128, n. 2, p. 170-179, 2004.

COLE, J.E.; GEORGIU, E.; MONACO, C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**. v. 2010, p. 393946, 2010.

CONTRERAS, R.J.; KING, S. High fat/sucrose feeding attenuates the hypertension of spontaneously hypertensive rats. **Physiology & Behavior**. v. 46, n. 2, p. 285-291, 1989.

CRACKOWER, M. A. S. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**. v. 417, n. 6891, p. 822-828, 2002.

CROWLEY, S.D. *et al.* Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 298, n. 4, p. R1089-R1097, 2010.

DANGE, R.B. *et al.* Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in Angiotensin II-induced hypertension. **Cardiovascular Research**. v. 103, n. 1, p. 17-27, 2014.

DANILCZYK, U.; PENNINGER, J.M. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. **Circulation Research**. v. 98, n. 4, p. 463-471, 2006.

DANSER, A.H.; SCHALEKAMP, M.A. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? **Heart**. v. 76, suppl 3. 28-32, 1996.

DASU, M.R. et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. **Diabetes Care**. v. 33, n. 4, p. 861-868, 2010.

DASU, M.R. et al. High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. **Diabetes**. v. 57, n. 11, p. 3090-3098, 2008.

DASU, M.R.; RIOSVELASCO, A.C.; JIALAL, I. Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo. **Atherosclerosis**. v. 202, n. 1, p. 76-83, 2009.

DAUBEUF, B. *et al.* TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock. **Journal of Immunology**. v. 179, n. 9, p. 6107-6114, 2007.

DAVIDGE, S.T.; PROSTAGLANDIN, H. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circulation Research**. v. 89, n. 8, p. 650-660, 2001.

DE GRAAF, R. et al. Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. **Microbes and Infection**. v. 8, n. 7, p. 1859-1865, 2006.

DELVES, P.J.; ROITT, D. The Immune System – First of two parts. **The New England Journal of Medicine**. v. 343, n. 1, p. 37-49, 2000.

DEN DEKKER, W.K. et al. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. **Atherosclerosis**. v. 209, n. 2, p. 314-20, 2010.

DESCHEPPER, C.F. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. **Kidney International**. v. 46, n. 6, p. 1561-1563, 1994.

DEVARAJ, S. *et al.* Increased Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with Type 1 Diabetes: further evidence of a proinflammatory state. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 93, n. 2, p. 578-583, 2008.

DIAS, Fernanda Moura Vargas. **Participação da Na⁺K⁺ ATPase e dos canais para K⁺ nas diferenças de reatividade de anéis isolados de aorta de ratos infartados com e sem sinais de insuficiência cardíaca**. 2011. 193f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

DIKALOV, S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 51, n. 7, p. 1289-1301, 2011.

DINH, Q.N. *et al.* Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 406960, 2014.

DOHI, Y. *et al.* Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries: effect of age and hypertension. **Hypertension**. v. 16, n. 2, p. 170-179, 1990.

DRUMMOND, G.R. *et al.* Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 10, n. 6, p. 453-471, 2011.

DZAU, V.J. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: Evidence, possibilities and hypotheses. **Journal of Hypertension**. v. 7, n.12, p. 933 -936, 1989.

EDFELDT, K. *et al.* Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. **European Heart Journal**. v. 25, n. 16, p. 1447-1453, 2004.

EISLER, R. *et al.* Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity. **Hypertension Research**. v. 34, n. 5, p. 551-558, 2011.

FAAS, M.M. et al. A new animal model for human preeclampsia: ultra-low-dose endotoxin infusion in pregnant rats. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 171, n. 1, p. 158-64, 1994.

FAGGIN, E. et al. Smooth muscle-specific SM22 protein is expressed in the adventitial cells of balloon-injured rabbit carotid artery. **Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 19, n. 6, p. 1393-1404, 1999.

FARIA, Thaís de Oliveira. **Efeitos cardiovasculares da associação entre baixas doses de cloreto de mercúrio e infarto do miocárdio em ratos**. 2014. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 e COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**. v. 164, n. 3, p. 894-912, 2011.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. **The American Journal of Physiology**. v. 291, n. 3, p. H985-H1002, 2006.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium - dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**. v. 93, n. 3, p. 515-524, 1988.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews**. v. 62, n. 2, p. 347-504, 1982.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FORT, M.M. *et al.* A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. **Journal of Immunology**. v. 174, n. 10, p. 6416-6423, 2005.

FRANTZ, S.; ERTL, G.; BAUERSACHS, J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**. v. 4, n. 8, p. 444-454, 2007.

FRANTZ, S. et al. Toll 4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 104, n. 3, p. 271-280, 1999.

FREIS, E.D. Age, race and sex and other indices of risk in hypertension. **The American Journal of Medicine**. v.55, n. 3, p. 275-280, 1973.

FREITAS, M.R. et al. Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. **Journal of Hypertension**. v. 21, n. 8, p. 1505-1512, 2003.

FRÖLICH, J.C.; FORSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research**. v. 19, p. 211-215, 1989.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. **Science**. v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.

FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factor. **FASEB Journal**. v. 3, n. 9, p. 2007-2018, 1989.

FURCHGOTT, R.F. The receptors for epinephrine and norepinephrine (adrenergic receptors). **Pharmacological Reviews**. v. 11, n. 2 (part 2), p. 429-41, 1959.

FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in response to vascular smooth muscle. **Circulation Research**. v. 53, n. 5, p. 557-572, 1983.

FURCHGOTT, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. The basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: VANHOUTTE, P.M. **Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium**. New York: Raven Press. p. 401-414, 1988.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GALÁN, M. et al. Angiotensin II differentially modulates cyclooxygenase-2, microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and prostaglandin I2 synthase expression in adventitial fibroblasts exposed to inflammatory stimuli. **Journal of Hypertension**. v. 29, n. 3, p. 529-536, 2011.

GANITKEVICH, V.Y.; ISENBERG, G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. **The Journal of Physiology**. v. 435, p. 187-205, 1991.

GARCÍA-REDONDO, A.B. et al. Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. **Journal of Hypertension**. v. 27, n. 9, p. 1814-1822, 2009.

GARCÍA-REDONDO, A.B. *et al.* Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A2, Ca²⁺, and superoxide anion levels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 328, n. 1, p. 19-27, 2009.

GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 83, n. 5, p. 1774-1777, 1989.

GE, T. et al. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H2 in the SHR aorta. **Circulation Research**. v. 76, n. 6, p. 1003-1010, 1995.

GENG, H.L. et al. Increased expression of Toll like receptor 4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease. **Clinical & Experimental Immunology**. v. 143, n. 2, p. 269-273, 2006.

GIBBONS, G.H.; DZAU, V.J. The emerging concept of vascular remodeling. **New England Journal of Medicine**. v. 330, n. 20, p. 1431-1438, 1994.

GONGORA, M.C. et al. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. **Hypertension**. v. 48, n. 3, p. 473-481, 2006.

GRIEDLING, K.; LASSEGUE, B.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. n. 36, p. 281-306, 1996.

GRIENGLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and vivo monitoring of ROS. **Circulation**. v. 108, n. 16, p. 1912-1916, 2003.

GRIENGLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**. v. 86, n. 5, p. 494-501, 2000.

GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, J. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 320, n. 6061, p. 454-456, 1986.

GUZIK, T.J. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 204, n. 10, p. 2449-60, 2007.

HA, T. et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. **Cardiovascular Research**. v. 68, n. 2, p. 224-34, 2005.

HACKENTHAL, E.; GANTEN, P.M.; TAUGNER, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiological Reviews**. v. 70, n. 4, p. 1067-1116, 1990.

HALL, J.E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Molecular Biotechnology**. v. 24, n. 1, p. 27-39, 2003.

HARRISON, D.G.; VINH, A.; LOB, H.; MADHUR, M.S. Role of the adaptive immune system in hypertension. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 10, n. 2, p. 203-207, 2010.

HARRAP, S.B. Hypertension: genes versus environment. **Lancet**. v. 344, n. 8916, p. 169-171, 1994.

HEDNET, T.; SUN, X. Measures of endothelial function as an endpoint in hypertension? **Blood Pressure**. v. 2, p. 58-66, 1997.

HENRION, D. et al. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclooxygenase-2. **British Journal of Pharmacology**. v. 121, n. 1, p. 83-90, 1997.

HERNANZ, R. et al. Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 287, n. 1, p. H225-H234, 2004.

HOCH, N.E. *et al.*, Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 296, n. 2, p. R208-16, 2009.

HOMMES, D.W.; PEPPELENBOSCH, M.P.; VAN DEVENTER, S.J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. **Gut**. v. 52, n. 1, p. 144-151, 2003.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews**. v. 76, n. 4, p. 967-1003, 1996.

HU, Z.W. et al. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2 implications for the function of vascular smooth muscle cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 303, n. 2, p. 563-573, 2002.

INTEGAN, H.D.; SCHIFFRIN, E.L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension**, v. 36, n. 3, p. 312-318, 2000.

IWASE, M. *et al.* Effects of monosodium glutamate-induced obesity in spontaneously hypertensive rats vs. Wistar Kyoto rats: serum leptin and blood flow to brown adipose tissue. **Hypertension Research**. v. 23, n. 5, p. 503-510, 2000.

IWASE, M. *et al.* Obesity induced by neonatal monosodium glutamate treatment in spontaneously hypertensive rats: an animal model of multiple risk factors. **Hypertension Research**. v. 21, n. 1, p. 1-6, 1998.

JACKSON, W.F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**. v. 35, n. 1 Pt 2, p. 173-178, 2000.

JAMES, P. A. *et al.* 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **The Journal of the American Medical Association**. v. 311, n. 5, p. 507-520, 2014.

JASTRZEBSKI, M *et al.* Increased levels of inflammatory markers in hypertensives with target organ damage. **Kardiologia Polska**. v. 64, n. 8, p. 802-809; 2006.

JI, Y. *et al.* Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 23, n. 4-6, p. 265-276, 2009.

JI, Y. *et al.* PPAR γ agonist, rosiglitazone, regulates angiotensin II-induced vascular inflammation through the TLR4-dependent signaling pathway. **Laboratory Investigation**. v. 89, n. 8, p. 887-902, 2009.

JIA, Z. *et al.* Microsomal prostaglandin synthase-1-derived prostaglandin E2 protects against angiotensin II-induced hypertension via inhibition of oxidative stress. **Hypertension**. v. 52, n. 5, p. 952-959, 2008.

JIALAL, I.; KAUR, H.; DEVARAJ S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 99, n. 1, p. 39-48, 2014.

JIN, J. *et al.* Coactivation of TLR4 and TLR2/6 coordinates an additive augmentation on IL-6 gene transcription via p38MAPK pathway in U937 mononuclear cells. **Molecular Immunology**. v. 49, n. 3, p. 423-432, 2011.

JOYNER, M.J.; CHARKOUDIAN, N.; WALLIN, B.G. Sympathetic nervous system and blood pressure in humans: individualized patterns of regulation and their implications. **Hypertension**. v. 56, n. 1, p. 10-6, 2010.

KAITO, S, *et al.* Effects of pressure- or volume-overload hypertrophy on passive stiffness in isolated adult cardiac muscle cells. **The American Journal of Physiology**, v. 271, n. 6 Pt 2, p. H2572–H2583, 1996.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**. v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

KAWAMOTO, T. *et al.* TAK-242 selectively suppresses Toll-like receptor 4 signaling mediated by the intracellular domain. **European Journal of Pharmacology**. v. 584, n. 1, p. 40-48, 2008.

KELLY, D.J. *et al.* Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. **Hypertension**. v. 44, n. 2, p. 195-202, 2004.

KIFOR, I.; DZAU, V.J. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin. **Circulation Research**. v. 60, n. 3, p. 422-428, 1987.

KIM, F. *et al.* Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. **Circulation Research**. v. 100, n. 11, p. 1589-1596, 2007.

KIM, H.R. *et al.* Smooth muscle signaling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 12, n. 6A, p. 2165-2180, 2008.

KIM, Y.M. *et al.* Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals", the innate immune system, and preeclampsia? **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 193, n. 3 Pt 3, p. 921-927, 2005.

KOH, K.K.; OH, P.C.; QUON, M.J. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? **Cardiovascular Research**. v. 81, n. 4, p. 649-659, 2009.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 88, n. 11, p. 4651-4655, 1991.

KÜPER, C.; BECK, F.X.; NEUHOFER, W. Toll-like receptor 4 activates NF- κ B and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. **American Journal Physiology. Renal Physiology**. v. 302, n. 1, p. F38-F46. 2012.

LASSÈGUE, B.; SAN MARTÍN, A.; GRINDLING, K.K. Biochemistry, physiology and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circulation Research**. v. 110, n. 10, p. 1364-1390, 2012.

LAWES, C.M.; VANDER HOORN, S.; RODGERS, A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. **Lancet**. v. 371, n. 9623, p. 1513-1518, 2008.

LEE, E.Y. *et al.* Angiotensin II receptor blocker attenuates overexpression of vascular endothelial growth factor in diabetic podocytes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 36, n. 1, p. 65-70, 2004.

LEE, L.; WEBB, R.C. Endothelium-dependent relaxation and L-arginine metabolism in genetic hypertension. **Hypertension**. v. 19, n. 5, p. 435-441, 1992.

LEE, C.H.; WEI, Y.H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. **Experimental Biology and Medicine**. v. 232, n. 5, p. 592-606, 2007.

LEE, T.J.; SHIRASAKI, Y.; NICKOLS, G.A. Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. **Blood Vessels**. v. 24, n. 3, p. 132-136, 1987.

LI, L. *et al.* Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacological Research**. v. 58, n. 3-4, p. 196-201, 2008.

LI, H. *et al.* Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 47, n. 12, p. 2536-2544, 2006.

LI, M. *et al.* A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. **Molecular Pharmacology**. v. 69, n. 4, p. 1288-1295, 2006.

LIANG, C.F. *et al.* Toll-Like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH Oxidase isoforms 1 and 4. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 33, p. 777-784, 2013.

LIEW, F.Y.; LIU, H.; XU, D. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. **Immunology Letters**. v. 96, n. 1, p. 27-31, 2005.

LIMAS, C.; WESTRUM, B.; LIMAS, C.J. The evolution of vascular changes in the spontaneously hypertensive rat. **The American Journal of Pathology**. v. 98, n. 2, p. 357-384, 1980.

LINCOLN, T.M.; DEY, N.; SELLAK, H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of Applied Physiology**. v. 9, n. 3, p. 1421-1430, 2001.

LOHR, J.; KNOECHEL, B.; ABBAS, A.K. Regulatory T cells in the periphery. **Immunological Reviews**. v. 212, p. 149-162, 2006.

LUND-JOHANSEN, P. Haemodynamics en early essential hypertension-still an area of controversy. **Journal of Hypertension**. v. 1, n. 3, p. 209-213, 1983.

LUSCHER, T.F. *et al.* Endothelium dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 11, n. 6 Pt 2, p.573-578, 1988.

LÜSCHER, T.F.; RAIJ, L.; VANHOUTTE, P.M. Effect of hypertension and its reversal on endothelium-dependent relaxation in the aorta. **Journal of Hypertension**. v. 5, suppl. 5, p. 5153-5155, 1987.

LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. v. 8, n. 4, p. 344-348, 1986.

LV, J. *et al.* Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 380, n. 1, p. 81-86, 2009.

MADHUR, M.S. *et al.* Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. **Hypertension**. v. 55, n. 2, p. 500-507, 2010.

MANTELLI, L.; AMERINI, S.; LEDDA, F. Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 25, n. 4, p. 595-602, 1995.

MARDINI, I.A.; FITZGERALD, G.A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a group class of anti-inflammatory drugs. **Molecular Interventions**. v. 1, n. 1, p. 30-38, 2001.

MARÍN, J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. **Journal of Autonomic Pharmacology**. v. 13, n. 2, p. 127-176, 1993.

MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M.A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 75, n. 2, p. 111-134, 1997.

MARÍN, J.; SÁNCHEZ-FERRER, C. F.; SALAICES, M. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. **British Journal of Pharmacology**. v. 93, n. 1, p. 43-52, 1988.

MARKETOU, M.E. *et al.* TLR2 and TLR4 gene expression in peripheral monocytes in nondiabetic hypertensive patients: the effect of intensive blood pressure lowering. **Journal of Clinical Hypertension**. v. 14, n. 5, p. 330-335, 2012.

MARTÍN, A. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. **Journal of Hypertension**. v. 30, p. 2, 315-326, 2012.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. *et al.* Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 18, n. 1, p. 51-65, 2013.

MARVAR, P.J. *et al.* Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. **Circulation Research**. v. 107, n. 2, p.263-270.

MATZINGER, P. An innate sense of danger. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 961, p. 341-342, 2002.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**. v. 296, n. 5566, p. 301-305, 2002.

MCCARTHY, C.G. *et al.* Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 306, n. 2, p. H184-H196, 2014.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Jr. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**. v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**. v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.

MEHTA, P.K.; GRIENGLING, K.K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v. 292, n. 1, p.C82-C97, 2007.

MICHELTSEN, K.S. et al. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. **Journal of Immunology**. v. 173, n. 10, p. 5901-5907, 2004.

MILLER, J.Z. et al. Association of blood groups with essential and secondary hypertension. **Hypertension**. v. 1, n. 5, p. 493-497, 1979.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**. v. 147, suppl 1, p. S193-201, 2006.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall: an explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**. v. 11, n. 3, p. 323-344, 1977.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGES, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MUELLER, C.F. et al. Redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 25, n. 2, p. 274-278, 2005.

MULVANY, M.J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News in Physiological Sciences**. v. 17, p. 105-109, 2002.

MULVANY, M.J. Structural abnormalities of the resistance vasculature in hypertension. **Journal of Vascular Research**. v. 40, n. 6, p. 558-560, 2003.

MULVANY, M.J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**. v. 41, n. 1, p. 19-26, 1977.

MULVANY, M.J.; NYBORG, N. An increased calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 71, n. 2, p. 585-596, 1980.

NATARAJ, C. *et al.* Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. **Journal of Clinical Investigation**. v. 104, n. 12, p. 1698-1701, 1999.

NAVA, E.; NOLL, G.; LÜSCHER, T.F. Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneously hypertension. **Circulation**. v. 91, n. 9, p. 2310-2313, 1995.

NIELSEN, K. C.; OWMAN, C. Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. **Brain Research** v. 27, n. 1, p. 33-42, 1971.

O'BRIEN, J.E.Jr. *et al.* Early injury to the media after saphenous vein grafting. **Annals of Thoracic Surgery**. v. 65, n. 5, p. 1273-127, 1998.

OFOSU-APPIAH, W. *et al.* Neutrophil-mediated damage to vascular endothelium in the spontaneously hypertensive rat. **Clinical Immunology and Immunopathology**. v. 83, n. 3, p. 293-301, 1997.

OGAWA, K. *et al.* Brain AT1 receptor activates the sympathetic nervous system through toll-like receptor 4 in mice with heart failure. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 58, n. 5, p. 543-549, 2011.

OHNAKA, K. *et al.* Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension**. v. 35, n. 1 Pt 1, p. 68-75, 2000.

OHTSU, H. *et al.* Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 7, n. 9-10, p. 1315-1326, 2005.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**. v. 27, p. 282-93, 1963.

OTSUI, K. *et al.* Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. **Heart Vessels**. v. 22, n. 6, p. 416-422, 2007.

OWENS, A.P.3rd. *et al.* MyD88 deficiency attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation independent of signaling through Toll-like receptors 2 and 4. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. v. 31, n. 12, p. 2813-2819, 2011.

OYAMA, J. *et al.* Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. **Circulation**. v. 109, n. 6, p. 784-789, 2004.

PACQUELET, S. *et al.* Croos-talk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. **The Biochemical Journal**. v. 403, n. 3, p. 451-461, 2007.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PANZA, J.A. *et al.* Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **The New England Journal of Medicine**. v. 323, n. 1, p. 22-27, 1990.

PARASURAMAN, S.; RAVEENDRAN, R. Measurement of invasive blood pressure in rats. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**. v. 3, n. 2, p. 172-177, 2012.

PARK DW *et al.* Activation of toll-like receptor 4 modulates vascular endothelial growth factor synthesis through prostacyclin-IP signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 362, n. 4, p. 1090-1095, 2007.

PARK, H.S.. *et al.* Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. **Cardiovascular Research**. v. 72, n. 3, p. 447-455, 2006.

PASTERKAMP, G.; VAN KEULEN, J.K.; DE KLEJIN, D.P. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 34, n. 5, p. 328-334, 2004.

PAUL, M.; MEHR, A.P.; KREUTZ, R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews** v. 86, n. 3, p. 747-803, 2006.

PAULETTO, P.; RATTAZZI, M. Inflammation and hypertension: the search for a link. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 21, n. 4, p. 850-853, 2006.

PEREIRA, C.A.; KRIGER, J.E. Dos fatores de risco clássicos ao perfil de risco individualizado. **Hipertensão**. v. 8, p. 131-137, 2005.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. In: FILHO, G.B. **Bogliolo: Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Kooganp. p. 111-147, 1998.

PÉREZ-GIRÓN, J.V. *et al.* Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through the inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from SHR rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 306, n. 11, p. H1582-1593, 2014.

PERSSON, P.B.; SKALWEIT, A.; THIELE, B.J. Controlling the release and production of renin. **Acta Physiologica Scandinavica**. v. 181, n. 4, p. 375-381, 2004.

PERTICONE, F. *et al.* Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. **Circulation**. v. 104, n. 2, p. 191-196, 2001.

PI, Y. *et al.* Inhibition of reactive oxygen species generation attenuates TLR4-mediated proinflammatory and proliferative phenotype of vascular smooth muscle cells. **Laboratory Investigation**. v. 93, n. 8, p. 880-887, 2013.

PICCININI, A.M.; MIDWOOD, K.S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. **Mediators of Inflammation**. v. 2010, 2010.

PINEDA, A. *et al.* Expression of Toll-like Receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 is increased in placentas from patients with preeclampsia. **Archives of Medical Research**. v. 42, n. 5, p. 382-391, 2011.

PLEINER, J. et al. High doses of vitamin C reverse Escherichia coli endotoxin-induced hyporeactivity to acetylcholine in the human forearm. **Circulation**. v. 106, n. 12, p. 1460-1464, 2002.

QUINN, S.J.; WILLIAMS, G.H. Regulation of aldosterone secretion. **Annual Review of Physiology**. v. 50, p. 409-426, 1988.

RAJAGOPALAN, S. et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 97, n. 8, p. 1916-1923, 1996.

RATZ, P.H. et al. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v. 288, n. 4, p. C769–C783, 2005.

RIZZONI, D. et al. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. **Hypertension**. v. 28, n. 5, p. 785-790, 1996.

ROSSI, M. et al. Cutaneous vasodilation to acetylcholine in patients with essential hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 29, n. 3, p. 406-411, 1997.

RUBANYI, G.M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 22, suppl. 4, p. 1-14, 1993.

RUBANYI, G.M.; VANHOUTTE, P.M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. **The American Journal of Physiology**. v. 250: n. 5 Pt 2, p. H815-H821, 1986.

RYAN, K.A. et al. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF- κ B and interleukin-8 expression. **Infection and Immunity**. v. 72, n. 4, p. 2123-2130, 2004.

SALES, M.L. et al. The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. **Clinica Chimica Acta**. v. 411, n. 9-10, p. 744-748, 2010.

SAN JOSE, G. et al. Insulin-induced NADPH oxidase activation promotes proliferation and matrix metalloproteinase activation in monocytes / macrophages. **Free Radical Biology and Medicine** v. 46, n. 8, p. 1058-1067, 2009.

SÁNCHEZ-LEMUS, E. *et al.* Angiotensin II AT1 blockade reduces the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat spleen. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 296, n. 5, p. R1376-R1384, 2009.

SANCHEZ-LEMUS, E. *et al.* Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. **Endocrinology**. v. 149, n. 10, p. 5177-5188, 2008.

SANZ-ROSA, D. et al. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 288, n. 1, p. H111-H115, 2005.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E.L. Inflammation in hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. v. 15, n. 2, p. 152-158, 2006.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E.L. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Clinical Science**. v. 112, n. 7, p. 375-384, 2007.

SCHIFFRIN, E.L. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 38, suppl 2, p. S3-S6, 2001.

SCHIFFRIN, E.L. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. **Clinical Science**. v. 126, n. 4, p. 267-274, 2014.

SCHIFFRIN, E.L. The immune system: role in hypertension. **The Canadian Journal of Cardiology**. v. 29, n. 5, p. 543-548, 2013.

SCHIFFRIN, E.L. Vascular endothelin in hypertension. **Vascular Pharmacology**. v. 43, n. 1, p. 19-29, 2005.

SCHONBECK, U. et al. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. **The American Journal of Pathology**. v. 155, n. 4, p.1281-1291, 1999.

SCHULZ, E.; GORI, T.; MÜNDEL, T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Hypertension Research**. v. 34, n. 6, p. 665-673, 2011.

SCHWAB, J.M. *et al.* COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. v. 69, n. 5, p. 339-343, 2003.

SCHWARTZ, S.M.; DEBLOIS, D.; O'BRIEN, E.R. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. **Circulation Research**. v. 77, n. 3, p. 445-465, 1995.

SEDEEK, M. *et al.* Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. v. 18, n. 2, p. 122-127, 2009.

SESSO, H.D. et al. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. **The Journal of The American Medical Association**. v. 290, n. 22, p. 2945-2951, 2003.

SINDHU, R.K. et al. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1743, n. 1-2, p. 86-92, 2005.

SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, n. 52, p. 33157-33160, 1996.

SOLLINGER, D. *et al.* Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signalling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension. **Cardiovascular Research**. v. 101, n. 3, p. 464-472, 2014.

SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 159, n. 1, p. 129-145, 1968.

SONG, M.J. *et al.* Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 346, n. 3, p. 739-745, 2006.

STECKELINGS, U.M.; KASCHIMA, E.; UNGER, T. The AT2 receptor: a matter of love and hate. **Peptides**. v. 26, n. 8, p. 1401-1409, 2005.

STULL, J.T. *et al.* Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. **Hypertension**. v. 17, n. 6 Pt 1, p. 723-732, 1991.

SUZUKI, H. *et al.* In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. v. 25, n. p. 1083-1089, 1995.

SUZUKI, H. *et al.* Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. **Current Medicinal Chemistry - Cardiovascular & Hematological Agents**. v. 3, n.4, p. 305-322, 2005.

SZASZ, T. *et al.* A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. **Experimental Biology and Medicine**. v. 232, n. 1, p. 27-37, 2007.

SZOCS, K. *et al.* Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 22, n. 1, p. 21-27, 2002.

TABERNERO, A.; GIRALDO, J.; VILA, E. Modelling the changes due to the endothelium and hypertension in the alpha-adrenoreceptor-mediated responses of rat aorta. **Journal of Autonomic Pharmacology**. v. 19, n. 4, p. 219-228, 1999.

TADDEI, S. et al. A cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. **Hypertension**. v. 29, n. 1 Pt 2, p. 274-279, 1997.

TADDEI, S. et al., A. Vasodilatation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. **Hypertension**. v. 21, n. 6 Pt 2, p. 929-933, 1993.

TAKAHASHI, Y. et al. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. **Clinical Science**. v. 119, n. 9, 395-405, 2010.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**. v. 21, p. 335-376, 2003.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**. v.140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TANG, E.H, et al. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **British Journal of Pharmacology**. v. 151, n. 1, p. 15-23, 2007.

TAYLOR, S.G.; WESTON, A.H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 9, n. 8, p. 272-274, 1988.

THABET, S.R. et al. The role of CD8+ T cells, IP-10 and MMP12 in hypertension. **Hypertension**. v. 58, n. 5, p. E33-E183, 2011.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 122, n. 4, p. 339-352., 2004.

TOUYZ, R.M. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. **Current Opinion Nephrology and Hypertension**. v. 14, n. 2, p. 125-131, 2005.

TOUYZ, R.M.; BRIONES, A.M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**. v. 34, n. 1, p. 5-14, 2011.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, G. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSAN, M.F.; GAO, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 76, n. 3, p. 514-519, 2004.

UNGVARI, Z.; KOLLER, A. Endothelin and prostaglandin H₂/thromboxane A₂ enhance myogenic constriction in hypertension by increasing Ca²⁺ sensitivity of arteriolar smooth muscle. **Hypertension**. v. 36, n. 5, p. 856-861, 2000.

VAN DER MEER, A. D. et al. A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**. v. 298, n. 2, p. H719-H725, 2010.

VANE, J.R. et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 91, n. 6, p. 2046–2050, 1994.

VANHOUTTE, P.M.; BOULANGER, C.M. Endothelium-dependent responses in hypertension. **Hypertension Research**. v. 18, n. 2, p. 87-98, 1995.

VANHOUTTE, P.M. Other endothelium-derived vasoactive factors. **Circulation**. v. 87, suppl V, p. V9-V17, 1993.

VASQUEZ-VIVAR, J. *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 95, n. 16, p. 9220-9225, 1998.

VASSALLO, P.F. *et al.* The left ventricular contractility of the heart I modulated by changes in flow and α 1–adrenoceptor stimulation. **Brazilian Journal of Biological Research**. v. 31, n. 10, p. 1353-1359, 1998.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Revista Hipertensão**. v. 13, n. 1, p. 1-68, 2010.

VICTOR, R.G. Systemic Hypertension: Mechanisms and Diagnosis. In: BONOW, R.O. *et al.*: **Braunswald's Heart Disease**: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 935-954, 2012.

VIRDIS, A.; DELL'AGNELLO, U.; TADDEI, S. Impact of inflammation on vascular disease in hypertension. **Maturitas**. v. 78, n. 3, p. 179-183, 2014

VIRDIS, A.; DURANTI, E.; TADDEI, S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. **International Journal of Hypertension**. v. 2011, 2011.

VIRDIS, A.; SCHIFFRIN E.L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? **Current Opinion Nephrology Hypertension**. v. 12, n. 2, p.181-187, 2003.

WANG, M.; FITZGERALD, G.A. Cardiovascular biology of microsomal prostaglandin E synthase-1. **Trends in Cardiovascular Medicine**. v. 20, n. 6, p. 189-195, 2010.

WANG, Y. *et al.* Toll-like receptor signaling pathways and the evidence linking toll-like receptor signaling to cardiac ischemia/reperfusion injury. **Shock**. v. 34, n. 6, p. 548-557, 2010.

WESELER, A.R.; BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Current Hypertension Reports**. v. 12, n. 3, p. 154-161, 2010.

WEST, AP, *et al.* TLR signaling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. **Nature**. v. 472, n. 7344, p. 476-480, 2011.

WILLIAMS, S.P. *et al.*, Modulation of phorbol ester-induced contraction by endogenously released cyclooxygenase products in rat aorta. **The American Journal of Physiology**. v. 267, n. 5 Pt 2, p. H1654-1662, 1994.

WOLF, G. *et al.* Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 17, n. 6, p. 1585-1593, 2006.

WONG, S.L. *et al.* Pivotal role of protein kinase Cdelta in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 31, n. 5, p. 1169-1176, 2011.

WRIGHT, D.H. *et al.* Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 281, n. 5, p. R1343-R1360, 2001.

WU, J. *et al.* Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells. **Inflammation Research**. v. 58, n. 8, p. 473-482, 2009.

WU, K.K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. **Advances in Pharmacology**. v. 33, p. 179-207, 1995.

XAVIER, F.E. *et al.* Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. **Vascular Pharmacology**. v. 40, n. 1, p. 67-76, 2003.

XIA, Y *et al.* Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *Journal of Biological Chemistry*. v. 273, n. 40, p. 25804-25808, 1998.

XIE, B.G.; JIN, S.; ZHU, W.J. Expression of toll-like receptor 4 in maternal monocytes of patients with gestational diabetes mellitus. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 7, n. 1, p. 236-240, 2014.

XIE, F. *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 and the cryopyrin inflammasome in normal pregnancy and pre-eclampsia. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**. v. 117, n. 1, p. 99-108, 2010.

XIE, F. et al. Toll-like receptor signaling and pre-eclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**. v. 63, n. 1, p. 7-16, 2010.

YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. **Gastroenterology Research and Practice**. v. 2010, 2010.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. **Nature**. v. 322, n. 6163, p. 411-415, 1988.

YANG, J. *et al.* Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through TLR4/NFκB signalling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 330, n. 1-2, p. 39-46, 2009.

YUEN, C.Y. *et al.* From skeleton to cytoskeleton: osteocalcin transforms vascular fibroblasts to myofibroblasts via angiotensin II and Toll-like receptor 4. **Circulation Research**. v. 111, n. 3, p. e55-e66, 2012.

ZALEWSKI, A.; SHI, Y. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 17, n. 3, p. 417-22, 1997.

ZHANG, T., *et al.* Cardiovascular and analgesic effects of a highly palatable diet in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v. 48, n. 1, p. 57-61, 1994.

ZHANG, X., et al. Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. **International Journal of Epidemiology**. v. 32, n. 4, p. 563-572, 2003.

ZHANG, Z. et al. Toll-like receptor 4 signaling in dysfunction of cardiac microvascular endothelial cells under hypoxia/reoxygenation. **Inflammation Research**. v. 60, n. 1, p. 37-45, 2011.

ZINKEVICH, N.S.; GUTTERMAN, D.D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. **American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology**. v. 301, n. 3, p. H647-53, 2011.

8 ANEXO I

Artigo científico publicado relacionado ao tema desta tese

OPEN ACCESS Freely available online



Toll-Like Receptor 4 Upregulation by Angiotensin II Contributes to Hypertension and Vascular Dysfunction through Reactive Oxygen Species Production

Priscila R. De Batista^{1,2}, Roberto Palacios¹, Angela Martín¹, Raquel Hernanz¹, Cindy T. Médici², Marito A. S. C. Silva², Emilly M. Rossi², Andrea Aguado³, Dalton V. Vassallo², Mercedes Saldaña^{3*}, María J. Alonso^{1*}

1 Dept. of Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain, **2** Dept. of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil, **3** Dept. of Pharmacology, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Hypertension is considered as a low-grade inflammatory disease, with adaptive immunity being an important mediator of this pathology. TLR4 may have a role in the development of several cardiovascular diseases; however, little is known about its participation in hypertension. We aimed to investigate whether TLR4 activation due to increased activity of the renin-angiotensin system (RAS) contributes to hypertension and its associated endothelial dysfunction. For this, we used aortic segments from Wistar rats treated with a non-specific IgG (1 µg/day) and SHR rats treated with losartan (15 mg/kg·day), the non-specific IgG or the neutralizing antibody anti-TLR4 (1 µg/day), as well as cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) from Wistar and SHR rats. TLR4 mRNA levels were greater in the VSMC and aortas from SHR rats compared with Wistar rats; losartan treatment reduced those levels in the SHR rats. Treatment of the SHR rats with the anti-TLR4 antibody: 1) reduced the increased blood pressure, heart rate and phenylephrine-induced contraction while it improved the impaired acetylcholine-induced relaxation; 2) increased the potentiation of phenylephrine contraction after endothelium removal; and 3) abolished the inhibitory effects of tiron, apocynin and catalase on the phenylephrine-induced response as well as its enhancing effect of acetylcholine-induced relaxation. In SHR VSMCs, angiotensin II increased TLR4 mRNA levels, and losartan reduced that increase. CLI-095, a TLR4 inhibitor, mitigated the increases in NAD(P)H oxidase activity, superoxide anion production, migration and proliferation that were induced by angiotensin II. In conclusion, TLR4 pathway activation due to increased RAS activity is involved in hypertension, and by inducing oxidative stress, this pathway contributes to the endothelial dysfunction associated with this pathology. These results suggest that TLR4 and innate immunity may play a role in hypertension and its associated end-organ damage.

Citation: De Batista PR, Palacios R, Martín A, Hernanz R, Médici CT, et al. (2014) Toll-Like Receptor 4 Upregulation by Angiotensin II Contributes to Hypertension and Vascular Dysfunction through Reactive Oxygen Species Production. *PLoS ONE* 9(8): e104020. doi:10.1371/journal.pone.0104020

Editor: Yu Huang, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong

Received: February 13, 2014; **Accepted:** July 6, 2014; **Published:** August 5, 2014

Copyright: © 2014 De Batista et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by MINECO (SAF2012-36400), ISCIII (RD12/0042/0024), MEC (PHR2011-0001-PC), URJC (PRIN13_CS12), CAPES and PRONEX-FAPES/CNPq. PRB was a fellow of CAPES. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: mariajesus.alonso@urjc.es (MJA); mercedes.saldaña@uam.es (MS)

Introduction

Hypertension has been generally associated with structural and functional vascular alterations, and both endothelial dysfunction and increased vasoconstrictor responses are important features of this pathology. The reduced nitric oxide (NO) bioavailability caused by increased reactive oxygen species (ROS) production would explain these vascular alterations. In this context, in recent years, it has been proposed that low-grade inflammation plays a key role in the development and progression of hypertension [1–4]. Indeed, in hypertension, increases in the plasma levels of proinflammatory cytokines [1], in the ROS production [5,6] and in the vascular responses to lipopolysaccharide (LPS) [7–9] have been observed. It is worth noting that inflammation also induces endothelial dysfunction in humans and animals [9,10]. Increased activation of the renin-angiotensin system (RAS) seems to be associated with the inflammatory state observed in hypertension,

as well as with its associated vascular alterations [1,5,11,12]. Angiotensin II (Ang II), the effector peptide of RAS, is able to induce Toll-like Receptor 4 (TLR4), and it seems that TLR4-dependent signaling pathway contributes to the proinflammatory effects of this humoral factor [13–19].

TLRs belong to a large family of pattern recognition receptors that play important roles in mammalian defense systems against invading microorganisms. Among them, TLR4 is expressed on the surface of several cell types, including endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMCs). It recognizes and responds against LPS, the main component of the cell wall of Gram-negative bacteria, as well as other non-infectious compounds, such as the products of tissue death and/or damage (DAMP), heat shock proteins (Hsp), high-mobility group box 1 (HMGB1) protein, fibronectin, heparan sulfate and fibrinogen. After activation, TLR4 can initiate the innate and, subsequently, the adaptive immunity; both mechanisms are responsible for the inflammatory

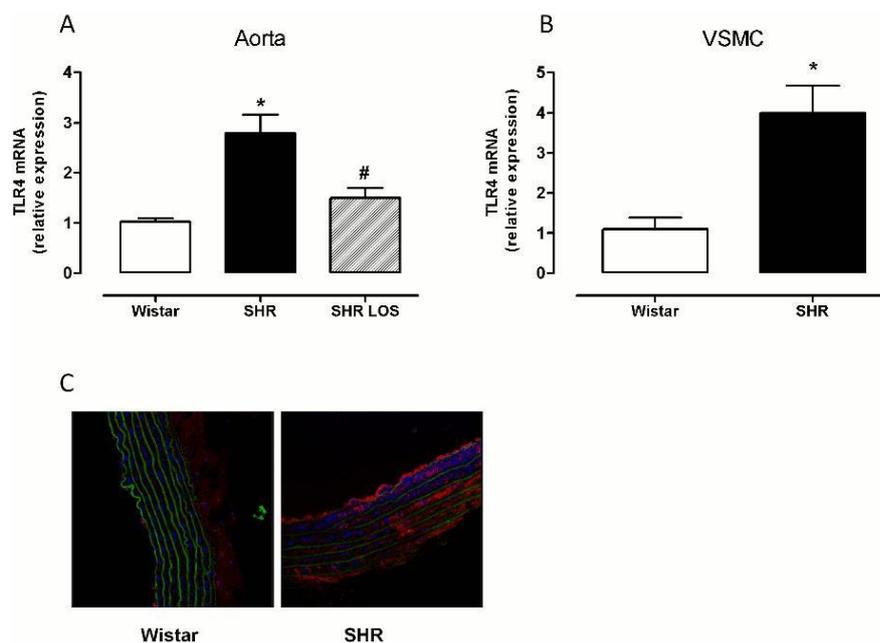


Figure 1. Ang II contributes to the increased TLR4 mRNA levels observed in SHRs. (A) TLR4 mRNA levels in aortic segments from Wistar, SHRs and SHRs treated with losartan (15 mg/kg-day in the drinking water, 12 weeks). (B) TLR4 mRNA levels in VSMCs from Wistar rats and SHRs. (C) Representative fluorescent confocal photomicrographs of TLR4 immunolocalization in aortic segments from Wistar and SHRs. Image size 238×238 μm . The results (mean±SEM) are expressed as the relative expression compared with the Wistar rats. * $P<0.05$ vs. Wistar, # $P<0.05$ vs. SHR using the Mann-Whitney nonparametric test. n = 6–7. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g001

response [20,21]. It has also been shown that upon TLR4 activation, LPS produces ROS such as superoxide anion and hydrogen peroxide [22–25], which also contribute to the inflammatory response.

The roles of the TLR4 signaling pathway in the processes underlying inflammatory vascular diseases including atherosclerosis [14], diabetes [26–28] or pre-eclampsia [29,30] have been reported. While several studies have addressed the contribution of adaptive immunity to the pathophysiology of hypertension, there are few studies regarding the role of the innate immune system in the context of this pathology [31–33]. Therefore, the aim of this study was to investigate whether TLR4 activation, due to increased RAS activity, contributes to hypertension and the functional vascular alterations observed in this pathology. The specific objectives were to investigate the following: 1) the alteration of TLR4 expression in hypertension and the contribution of Ang II to this alteration; 2) the role of TLR4 in hypertension occurrence, as well as in the associated vascular function alterations; and 3) the involvement of the TLR4-activated ROS production in the vascular dysfunction associated to this pathology.

Materials and Methods

Ethics statement and Animals

All experiments were approved by the Ethical Commission for the Use of Animals of Universidade Federal do Espírito Santo, Brazil (CEUA-UFES 042/2013) and by the Ethical Committee of Research of the Universidad Autónoma de Madrid, Spain (CEI-UAM 31-759). This study was carried out in strict accordance with the recommendations for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology, the guidelines for ethical care of experimental animals of the European Community, the current Spanish and European laws (RD 223/88 MAPA and 609/86), and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals.

Adults male spontaneously hypertensive (SHRs) and Wistar rats were used for these studies. Rats were housed under a 12 h light/12 h dark cycle, they had free access to water and were fed a standard rat chow *ad libitum*. In one set of experiments, we analyzed if hypertension alters TLR4 expression and its dependence on RAS activity. For this, we used Wistar rats and SHRs untreated and treated with the AT_1 receptor antagonist losartan (15 mg/kg-day in the drinking water, 12 weeks; generously supplied by Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA). Systolic arterial pressure was measured by tail plethysmography.

In another set of experiments, we investigated whether the TLR4 receptor plays a role in the occurrence of hypertension and

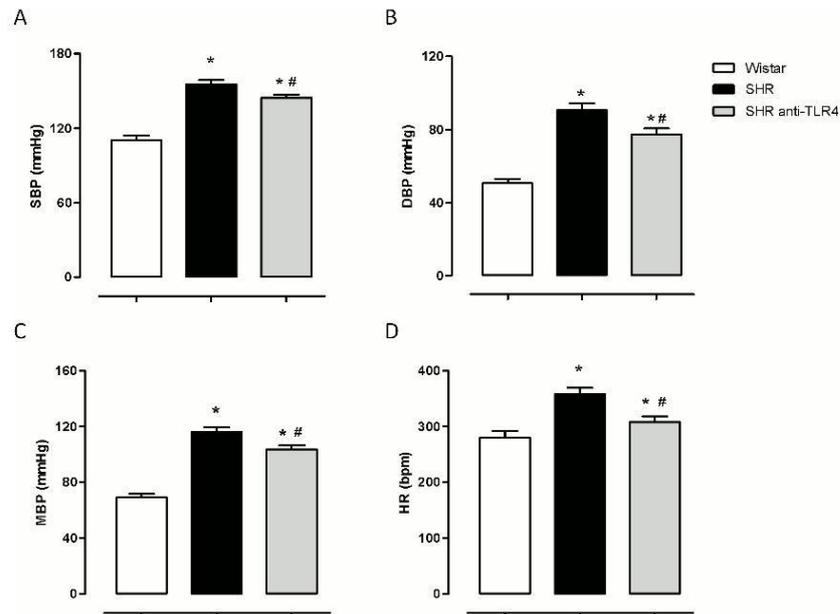


Figure 2. TLR4 inhibition reduces blood pressure and heart rate in hypertensive rats. (A) Systolic blood pressure (SBP), (B) diastolic blood pressure (DBP), (C) mean blood pressure (MBP) and (D) heart rate (HR) in Wistar and SHRs treated with a non-specific IgG (1 μ g/day, 15 days) and SHRs treated with anti-TLR4 antibody (1 μ g/day, 15 days). The results represent the mean \pm SEM. * P <0.05 vs Wistar, # P <0.05 vs. SHR using one way ANOVA and Bonferroni post-test. n = 8–9. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g002

the associated vascular alterations. For this, we used SHRs (258.5 \pm 10.9 g, n = 10) treated with an anti-TLR4 antibody (rat monoclonal IgG_{2a5}, 1 μ g/day saline-diluted, intraperitoneal injection,

15 days; sc-13591, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) and Wistar rats (272.1 \pm 15.7 g, n = 9) and SHRs (245.9 \pm 12.5 g, n = 9) treated with a non-specific IgG (IgG_{2a5},

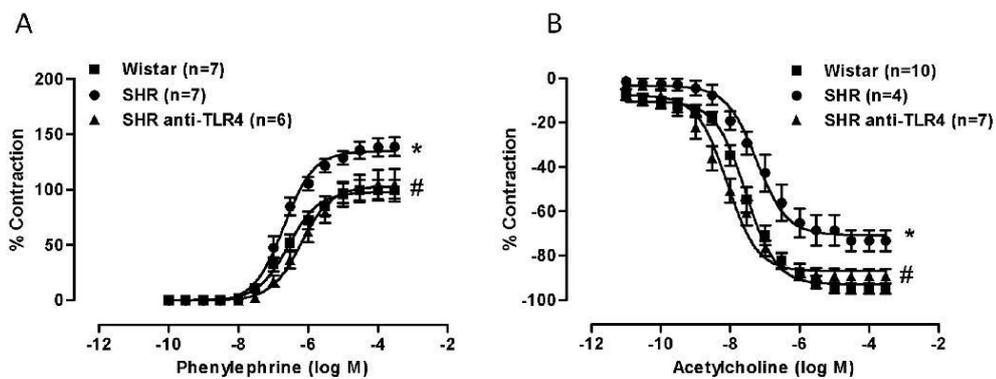


Figure 3. TLR4 inhibition reduces phenylephrine-elicited vasoconstriction and increases acetylcholine-elicited vasodilation in SHR aortas. Concentration-response curves to phenylephrine (A) and acetylcholine (B) in endothelium-intact aortic segments from Wistar and SHRs treated with a non-specific IgG (1 μ g/day, 15 days) and SHRs treated with anti-TLR4 antibody (1 μ g/day, 15 days). The results are the mean \pm SEM. * P <0.05 vs Wistar, # P <0.05 vs. SHR using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. The number of animals used is shown in parentheses. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g003

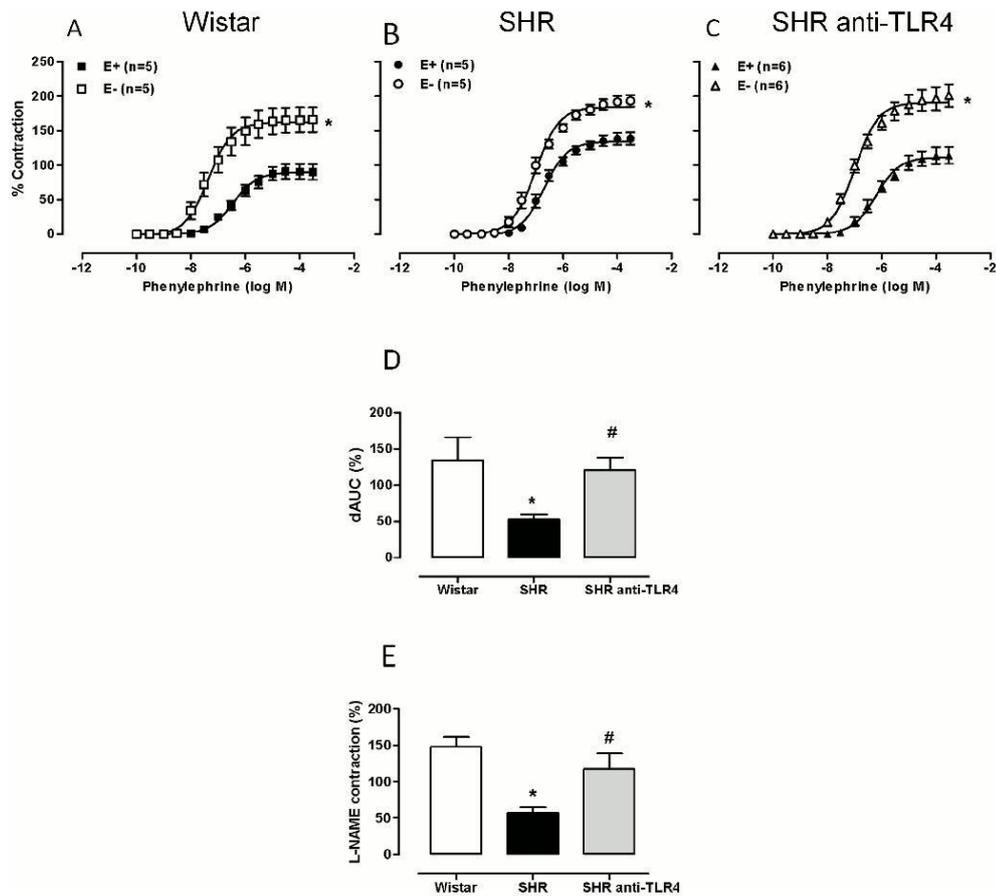


Figure 4. TLR4 inhibition increases endothelial modulation of vasoconstrictor responses. Concentration-response curves to phenylephrine in intact (E+) and endothelium denuded (E-) aortic segments from (A) Wistar and (B) SHRs treated with a non-specific IgG (1 μ g/day, 15 days) and (C) SHRs treated with anti-TLR4 antibody (1 μ g/day, 15 days). (D) Differences in the area under the concentration-response curve (dAUC) in the E- and E+ segments; AUC was calculated from the individual curve plots; the differences are expressed as a percentage of the AUC for the corresponding control situation. (E) Contractile response to L-NAME (100 μ M) after phenylephrine (1 μ M) contraction in segments from Wistar and SHRs treated with a non-specific IgG and SHRs treated with anti-TLR4 antibody; the results are expressed as the percentage of the previous contraction induced by phenylephrine. The results are the mean \pm SEM. * P <0.05 vs. E+ or vs. Wistar, # P <0.05 vs. SHR using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. The number of animals used is shown in parentheses. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g004

1 μ g/day, saline-diluted, intraperitoneal injection, 15 days; sc-2026, Santa Cruz Biotechnology Inc.) to rule out non-specific effects of the anti-TLR4 antibody treatment [32]. Hemodynamic parameters and vascular function in aortic rings were evaluated. To further elucidate the role of TLR4 in the Ang II effects, cell culture experiments using VSMCs from Wistar and SHR were used.

Rats were euthanized by CO₂, and all efforts were made to minimize suffering. Then, the aortas were removed and placed in cold (4°C) Krebs-Henseleit solution (KHS) (115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄·7H₂O,

2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 11.1 mM glucose, and 0.01 mM Na₂EDTA) aerated with a 95% O₂-5% CO₂ mixture (pH=7.4). Aortic segments were dissected free of fat and connective tissue and maintained in KHS. Segments used for gene expression studies were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C until the day of the experiment. The hearts were removed to assess cardiac hypertrophy. For this, the ratio between the heart dry weight and the length of the tibia was calculated.

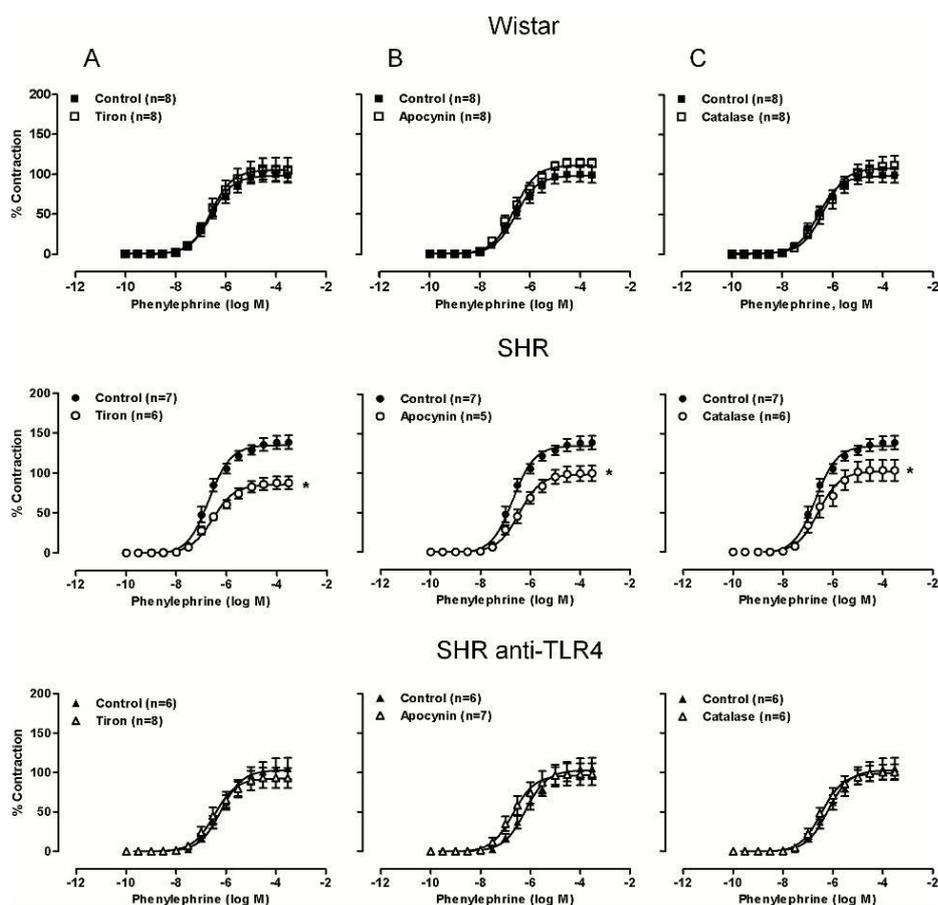


Figure 5. TLR4 inhibition abolishes the inhibitory effect of antioxidants on phenylephrine-induced contraction. Concentration-response curves to phenylephrine in aortic segments from Wistar and SHRs treated with a non-specific IgG (1 μ g/day, 15 days) and SHRs treated with anti-TLR4 antibody (1 μ g/day, 15 days) in the absence and presence of (A) tiron (1 μ M), (B) apocynin (30 μ M) and (C) catalase (1000 U/ml). Control curves were the same in the different situation of the three experimental groups. The results are the mean \pm SEM. * P < 0.05 vs. SHR using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. The number of animals used is shown in parentheses. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g005

Hemodynamic parameters

At the end of the treatment, body weight was recorded and the rats were anesthetized with urethane (4 g/kg of body weight, intraperitoneal injections). The right coronary artery was cannulated with a heparinized polyethylene catheter (PE-50) and connected to a data acquisition system with pressure transducers (TSD 104A, Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA) to measure hemodynamic parameters. Following an adaptation period of 30 min, systolic, diastolic, mean blood pressure and heart rate (SBP, DBP, MBP and HR, respectively) measurements were recorded.

Vascular function

Vascular function was studied in aortic segments by isometric tension recording using an isometric force transducer (TSD 125C) connected to an acquisition system (Biopac Systems, Inc.). Segments were initially exposed to 75 mM KCl to test their functional integrity, and the presence of endothelium was confirmed by the effect of 10 μ M acetylcholine in segments that previously contracted with 1 μ M phenylephrine. After a washout period, a single concentration-response curve to phenylephrine (0.1 nM–0.3 mM) or acetylcholine (0.01 nM–0.3 mM) was performed. Thus, parallel experiments in different aortic segments from the same animal were performed in the absence (control) and the presence of the NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin (30 μ M),

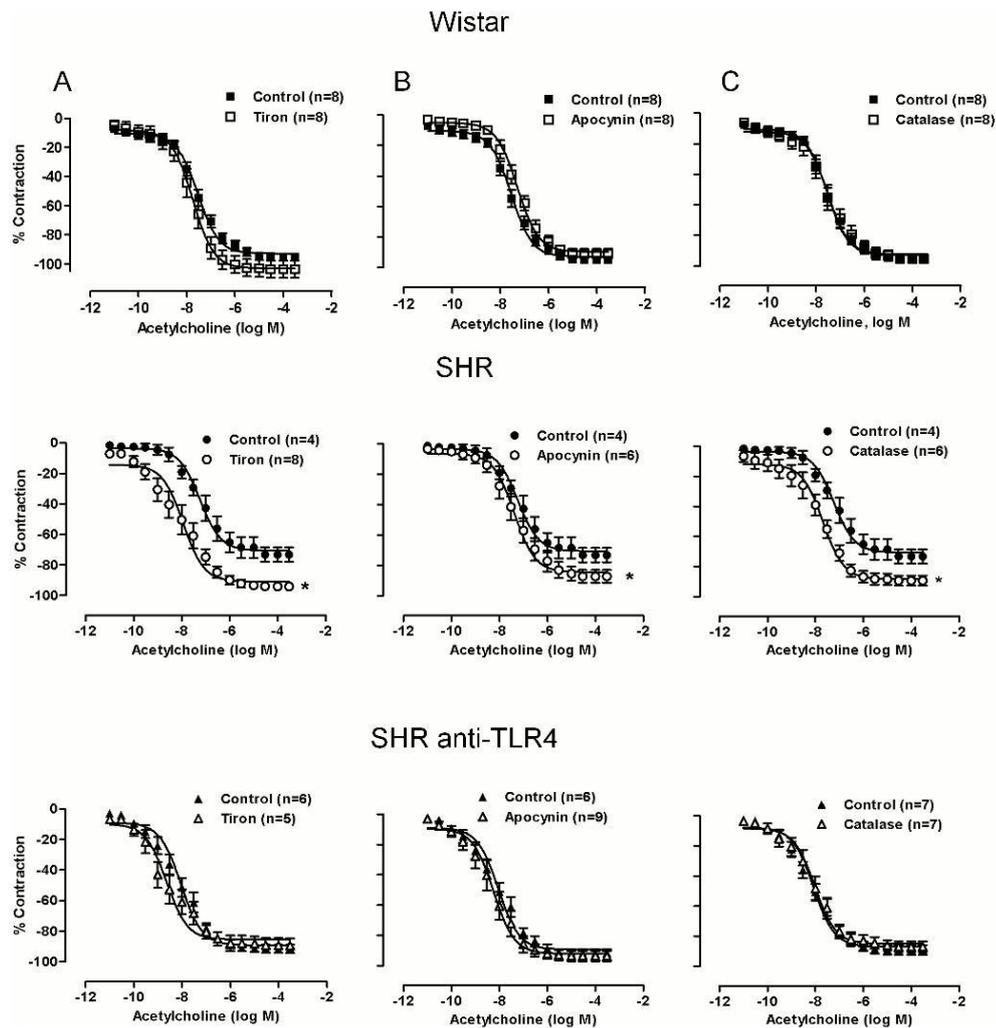


Figure 6. TLR4 inhibition abolishes the enhancing effect of antioxidants on acetylcholine-induced vasodilation. Concentration-response curves to acetylcholine in aortic segments Wistar and SHRs treated with a non-specific IgG (1 μ g/day, 15 days) and SHRs treated with anti-TLR4 antibody (1 μ g/day, 15 days) in the absence and presence of (A) tiron (1 μ M), (B) apocynin (30 μ M) and (C) catalase (1000 U/ml). Control curves were the same in the different situation of the three experimental groups. The results are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. SHR using two-way ANOVA and Bonferroni post-test. The number of animals used is shown in parentheses. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g006

the superoxide anion scavenger 4, 5-dihydroxy-1, 3-benzendisulphonic acid (tiron, 1 μ M) and the hydrogen peroxide detoxificant catalase (1000 U/ml). These drugs were administered 30 min prior to incubation with phenylephrine or acetylcholine.

The influence of endothelium on the response to phenylephrine was investigated after mechanical removal of this vascular component by rubbing the lumen with a needle. The absence of

endothelium was confirmed by the inability of 10 μ M acetylcholine to produce relaxation. To evaluate the NO component of the phenylephrine responses, the aortic rings were half-maximally pre-contracted with 1 μ M phenylephrine for 30 min; then, a non-selective inhibitor of NO synthesis, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M), was added for 45 min. The results of

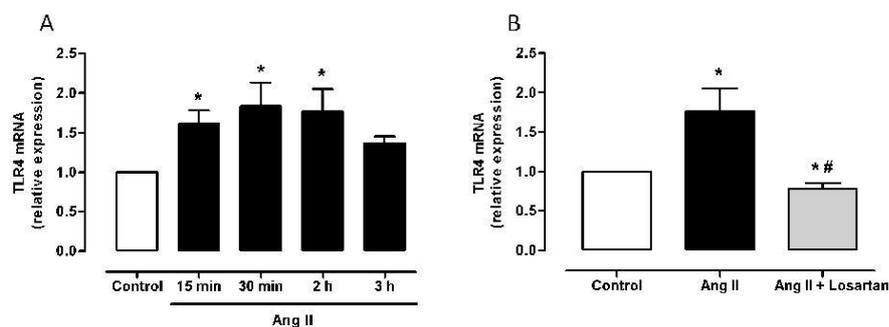


Figure 7. Ang II upregulates TLR4 expression in SHR VSMCs via the AT₁ receptors. (A) Effect of Ang II (100 nM, 15 min–3 h) on TLR4 mRNA levels in SHR VSMCs. (B) Effect of Ang II (2 h) on TLR4 mRNA levels in the absence and the presence of losartan (10 μM, 1 h). The results (mean ± SEM) are expressed as relative expression compared with control. * $P < 0.05$ vs Control, # $P < 0.05$ vs Ang II by Student's *t*-test. $n = 4–5$. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g007

the additional tone caused by L-NAME were expressed as the % of the previous contraction elicited by phenylephrine [34].

Immunofluorescence

TLR4 was immunolocalized as described [12]. Briefly, frozen transverse sections (14 μm) were cut on to gelatin coated slides and air-dried for at least 60 min. After blockade, sections were incubated with a polyclonal antibody against TLR4 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) in PBS containing 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma Chemical Co.) for 1 h at 37°C in a humidified chamber. After washing, rings were incubated with the secondary antibody, a goat anti-rat (1:200) IgG labeled with alexa fluor-546 dye (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) for 1 h at 37°C in a humid box. After washing, immunofluorescent signals were viewed using an inverted Leica TCS SP2 confocal laser-scanning microscope with oil immersion lens (x40). Alexa Fluor-labeled antibody was visualized by excitation at 546 nm and detection at 550–650 nm. The specificity of the immunostaining was evaluated by omission of the primary antibody and processed as above. Under these conditions, no staining was observed in the vessel wall. Nuclei were stained with 0.01 mg/ml DAPI (Molecular Probes Life Technologies) and visualized with excitation/emission wavelengths of 358/461 nm.

Cell Culture

To obtain primary cultures of VSMCs, thoracic aortas from SHR or Wistar rats were aseptically removed, cleaned of fat tissue and blood cells and placed in cold Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) containing 0.1% BSA, 200 U/ml penicillin and 200 μg/ml streptomycin. The aortas were digested in the same medium containing 2 mg/ml collagenase type II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and incubated for 30 min at 37°C in a humidified atmosphere of CO₂ (5%). After the adventitia was carefully removed, VSMCs were obtained using the explant method [35]. Cells were identified as VSMCs by morphological and growth characteristics and by positive immunocytochemical staining with a specific monoclonal anti- α -actin antibody (Sigma Chemical Co.). For experiments, cells from passages 2 to 5 were rendered quiescent by incubation in DMEM containing 0.2% FBS for 24 h. The cells were stimulated with 100 nM Ang II (for the times indicated in the results section), with or without pretreatment for

1 h with the TLR4 inhibitor CLI-095 (1 μM). The specificity of CLI-095 was confirmed by its capacity to abolish the induction of COX-2 expression in VSMCs following exposure to LPS (data not shown).

Quantitative PCR real time (qRT-PCR) assay

TLR4, NOX-1, NOX-2, NOX-4 and p22phox mRNA levels were determined in the aortic segments and/or VSMCs by qRT-PCR. Total RNA was obtained using the TRI Reagent (Sigma Chemical Co.), according to the manufacturer's recommendations, and was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR was performed using the fluorescent dye SyBR Green (iQ Taq FAST SyBR Green Supermix with ROX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) or using Taqman Gene Expression Assays (NOX-1: Rn00586652_m1; NOX-4: Rn00585380_m1, Applied Biosystems). The primer sequences used are: TLR4 (FW: TGTGCCCTTCAAACATGACTGG, RV: CTCCAAGATCAACCGATGG); p22phox (FW: GGACAGAAGTACCTGACCGC, RV: GATGGTGGCCAGCAGGAAG); NOX-2 (FW: CCAGTGAAGATGTGTTTCAGCT, RV: GCACAGC-CAGTAGAAGTAGAT). Cyclophilin D (Rn01458749_g1, Applied Biosystems) and β 2-microglobulin (Rn00560865_m1, Applied Biosystems) were used as normalizing internal controls. All PCRs were performed in duplicate. qRT-PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, from the Centro de Apoyo Tecnológico de URJC) using the following conditions: 2 min at 50°C; 10 min at 95°C; and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. At the end of the SyBR Green PCR, a final stage with a melting curve analysis was added to show the specificity of the product. To calculate the relative index of gene expression, we employed the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using the untreated samples for calibration.

Detection of ROS

The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate *in situ* superoxide anion production in VSMCs [35]. Hydroethidine freely permeates cells, and in the presence of superoxide anions it is oxidized to ethidium bromide, which is trapped by intercalation with DNA. Ethidium bromide is excited at 546 nm and has an emission wavelength of 610 nm. Briefly, VSMCs were plated onto glass coverslips placed in 6-well plates

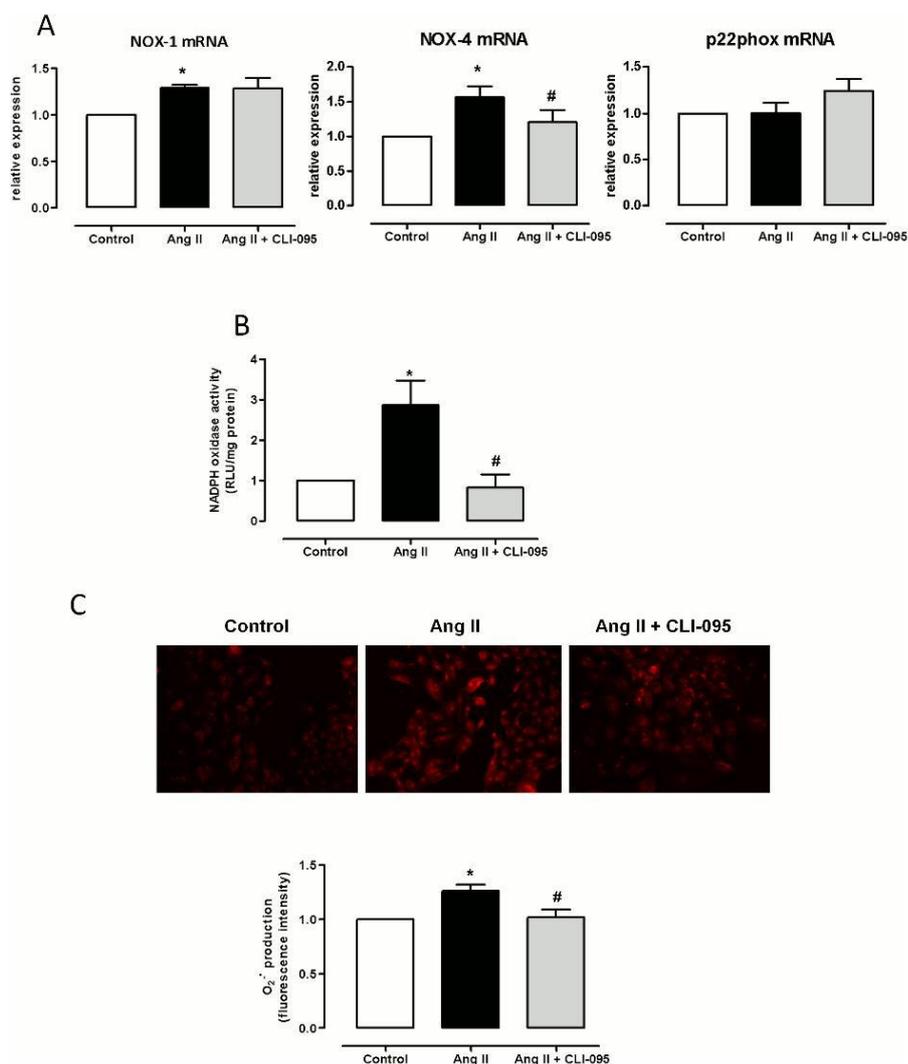


Figure 8. TLR4 inhibition reduces Ang II-induced NAD(P)H oxidase activity and O₂⁻ production in VSMC from SHR. Effects of CLI-095 (1 μ M, 1 h) on Ang II (100 nM, 2 h)-induced (A) NOX-1, NOX-4 and p22phox mRNA levels, (B) NAD(P)H oxidase activity and (C) O₂⁻ production in SHR VSMCs. The results (mean \pm SEM) are expressed as relative values compared with the control. * P <0.05 vs. Control, # P <0.05 vs. Ang II using Student's t-test or the Mann-Whitney nonparametric test. n = 4–6. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g008

and cultured as described above. Subconfluent cells were stimulated with 100 nM Ang II for 2 h in the absence or presence of 1 μ M CLI-095, which was added 1 h prior Ang II. The cells were then incubated with 10 μ M DHE in cell culture medium for 30 min at 37°C. The images were then acquired using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse T300, objective \times 20,

Nikon Corporation, Tokyo, Japan), captured using a digital spot camera (Diagnostic, Spectra Services, Ontario, NY, USA) and processed using the Metamorph image analysis software (Molecular Devices Corp., Downingtown, PA, USA). Non-stimulated VSMCs were imaged daily in parallel, using the same image settings throughout the course of the study. DHE fluorescence was

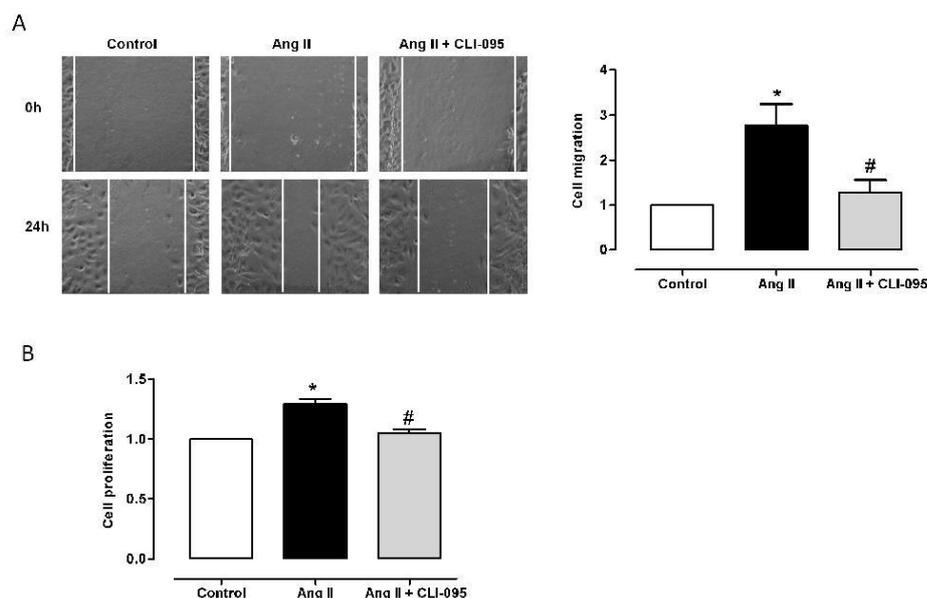


Figure 9. TLR4 inhibition reduces Ang II-induced cell migration and proliferation. (A) Wound healing assay showing SHR VSMC migration in response to Ang II (100 nM, 24 h) and effect of CLI-095 (1 μ M, 1 h). (B) Effect of CLI-095 on Ang II-induced proliferation. The results (mean \pm SEM) are expressed as relative values compared with the control. * $P < 0.05$ vs Control, # $P < 0.05$ vs. Ang II using Student's t-test. $n = 5$. doi:10.1371/journal.pone.0104020.g009

quantified in individual cell nuclei (10–20 nuclei/image/experimental condition). At least 5 independent experiments were performed. Then, we expressed the effects of the different drugs as fold increases over the control.

NAD(P)H oxidase activity

The superoxide anion generated by NAD(P)H oxidase activity was determined using a chemiluminescence assay using 5 μ M lucigenin and 100 μ M NAD(P)H. VSMCs treated as described for the ROS detection experiments were homogenized in a lysis buffer (50 mM KH_2PO_4 , 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 150 mM sucrose, pH = 7.4). The reaction was initiated with the addition of a mixture of lucigenin and NAD(P)H to the protein sample in a final volume of 300 μ l. Chemiluminescence was determined every 2.4 s for 5 min in a plate luminometer (AutoLumat LB 953, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany). A buffer blank was subtracted from each reading, and the value of the area under the curve was used to quantify chemiluminescence. The data obtained (counts/s) were expressed as fold increases over the control situation.

In vitro wound healing assay

To verify the role of TLR4 in Ang II-induced migration, a wound healing assay was performed. For this, the cells were seeded and cultured to confluence in a 24-well plate. Then, the cells were switched to serum-free medium for 24 h before the initiation of the experiments. A wound was made with a P10 pipette tip (CRP, with a filter). The medium was changed twice (5 ml/well) to wash away any cell debris remaining in the wound area. A line was

drawn through the center of the wells, perpendicular to the wound. A picture was taken at time zero at the site of intersection of the line and the wound. Then, the cells were treated for 1 h with 1 μ M CLI-095, followed by 100 nM Ang II. At 24 h, we took a picture in the same location. Adobe Photoshop CS2 was used to determine the area of wound closure compared to time 0 for the stimulus and with respect to the control situation.

Cell proliferation assay

Cell proliferation was assessed using the CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA). For this, VSMCs were seeded in 96-well plates (20×10^3 cells/well) in DMEM and were allowed to attach for 24–36 h. Then, the cells were switched to serum-free medium for 24 h. After this, cells were treated with 1 μ M CLI-095 for 1 h, followed by 100 nM Ang II for 24 h. The proliferative response was quantified by adding MTS tetrazolium solution (20 μ l/well). After 2–3 h of incubation, absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria). Different assays were performed in triplicate.

Drugs and reagents

l-phenylephrine hydrochloride, acetylcholine chloride, tiron, catalase, apocynin, lucigenin, salts and other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. and Merck (Darmstadt, Germany). DHE, streptomycin and penicillin were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), and CLI-095 was obtained from Invivogen (San Diego, CA, USA). All drugs were dissolved in distilled water, except for CLI-095, which was dissolved in

dimethyl sulfoxide (DMSO); 10 μ l of DMSO did not have any effect on VSMCs.

Statistical analyses

Vasoconstrictor responses induced by phenylephrine were expressed as the % of the tone generated by 75 mM KCl. Vasodilator responses induced by acetylcholine were expressed as the % of the previous tone in each case. The maximum response (Emax) and pD₂ values were calculated by non-linear regression analysis of each individual concentration-response curve using GraphPad Prism Software. To compare the effect of endothelium removal on the response to phenylephrine in segments from the three groups, the results are expressed as the differences of areas under the concentration-response curves (dAUC) in the control and experimental situations. AUCs were calculated from the individual concentration-response curve plots using a computer program (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA); the differences were expressed as the % of the AUC of the corresponding control situation.

The results are expressed as the mean \pm SEM (standard error of the mean) of the number of animals or the number of different cultures used in each experiment; differences were analyzed using Student's *t*-test or one- or two-way analyses of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni post hoc test, or Mann-Whitney nonparametric test by using GraphPad Prism Software. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Angiotensin II contributes to increased vascular TLR4 gene expression in SHR

TLR4 mRNA expression was greater in aortic segments from SHR when compared with those from Wistar rats; this greater expression was reduced after treatment of SHR with the AT₁ receptor antagonist losartan (Fig. 1A), which suggests that Ang II contributes to this increased expression. Similarly, TLR4 mRNA levels were greater in VSMCs from SHR than from Wistar rats (Fig. 1B).

Immunofluorescence experiments confirm the greater expression of TLR4 in aorta from SHR when compared with Wistar rats; this receptor was localized in the three layers of the vascular wall (Fig. 1C).

TLR4 inhibition reduces blood pressure and heart rate in hypertensive rats

At the end of the treatment, body weight (Wistar: 322.8 \pm 10.4 g, $n = 7$; SHR: 289.8 \pm 7.6 g, $n = 9$; anti-TLR4 SHR: 281.5 \pm 10.7 g, $n = 10$) and the tibia length (Wistar: 3.8 \pm 0.1; SHR: 3.4 \pm 0.1; anti-TLR4 SHR: 3.2 \pm 0.1 cm) was similar ($P > 0.05$) in the three animal groups. The heart weight:tibia length ratio was greater in SHR (0.346 \pm 0.022) as compared with Wistar rats (0.294 \pm 0.009), although the differences did not reach statistical significance ($P = 0.068$); treatment of SHR with anti-TLR4 antibody did not affect this ratio (0.346 \pm 0.009, $P > 0.05$).

As expected, SHR have greater levels of SBP, DBP, MBP and HR than Wistar rats (Fig. 2A–D). Anti-TLR4 antibody treatment of SHR lowered the SBP, DBP and MBP in SHR (Fig. 2A–C) compared with the controls. Additionally, the HR also decreased with treatment (Fig. 2D).

TLR4 inhibition reduces phenylephrine-elicited vasoconstriction and increases acetylcholine-elicited vasodilation in SHR aortas

The maximum response induced by 75 mM KCl was similar in the aortic rings from both Wistar (1.87 \pm 0.01 g; $n = 8$) and SHR (1.92 \pm 0.08 g, $n = 9$; $P > 0.05$). Treatment of SHR with the anti-TLR4 antibody did not modify KCl response (1.70 \pm 0.01 g, $n = 10$; $P > 0.05$). The contraction induced by phenylephrine was greater in aortic segments from SHR when compared with Wistar rats (pD₂ SHR: 6.69 \pm 0.07 *vs.* Wistar: 6.54 \pm 0.11, $P > 0.05$; Emax SHR: 135.7 \pm 8.0% *vs.* Wistar: 100.3 \pm 9.5%, $P < 0.05$; Fig. 3A); however, after anti-TLR4 antibody treatment of SHR the phenylephrine-induced responses were lower (pD₂ SHR anti-TLR4: 6.22 \pm 0.12, $P < 0.05$ *vs.* SHR; Emax SHR anti-TLR4: 105.2 \pm 13.4%, $P < 0.05$ *vs.* SHR; Fig. 3A). Furthermore, endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was lower in SHR (pD₂ SHR: 7.25 \pm 0.19 *vs.* Wistar: 7.46 \pm 0.16, $P > 0.05$; Emax SHR: 73.2 \pm 4.7% *vs.* Wistar: 95.3 \pm 2.4%, $P < 0.05$; Fig. 3B), being these responses increased by the anti-TLR4 antibody treatment (pD₂: 8.10 \pm 0.14, $P < 0.05$; Emax: 89.2 \pm 3.3%, $P < 0.05$; Fig. 3B).

To evaluate the influence of endothelium in the response to phenylephrine, this layer was mechanically removed. In these conditions, the response to phenylephrine was increased in the three groups (Fig. 4A–C); however, this increase was smaller in SHR, as shown by the analysis of dAUC values, while the anti-TLR4 antibody treatment restored this increase (Fig. 4D). These results suggest that hypertension reduces the endothelial modulation of phenylephrine responses and that the treatment reestablishes this modulation. The tension developed by the NO synthase antagonist L-NAME (100 μ M) after phenylephrine contraction was lower in SHR when compared with Wistar rats, and this contraction was increased after treatment of SHR with the anti-TLR4 antibody (Fig. 4E). These results indirectly suggest that treatment significantly increases NO production. Altogether, these results allow us to propose that the anti-TLR4 antibody treatment improves endothelial dysfunction in SHR, and this improvement most likely occurs by increasing NO bioavailability.

TLR4 inhibition decreases the contribution of oxidative stress to the vasoconstrictor and vasodilator responses in aortas from hypertensive rats

Endothelial dysfunction accompanying hypertension is frequently associated with reduction in NO bioavailability caused by increased ROS production, among other mechanisms. Therefore, we analyzed the effect of anti-TLR4 antibody treatment on the contribution of ROS to vascular function. The superoxide anion scavenger tiron, the NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin and the hydrogen peroxide detoxificant catalase did not affect phenylephrine-induced contraction in Wistar rats, while the three drugs reduced those responses in SHR (Fig. 5A–C). Treatment with the anti-TLR4 antibody completely abolished the inhibitory effect of the three antioxidants analyzed (Fig. 5A–C).

On the other hand, tiron, apocynin and catalase did not affect acetylcholine-induced relaxation in Wistar rats but increased that response in SHR; after anti-TLR4 antibody treatment of SHR the enhancing effect of the three compounds was abolished (Fig. 6A–C). Altogether, these results suggest that TLR4 increased oxidative stress and this would contribute to the impaired vascular function observed in aortas from hypertensive rats. In an attempt to investigate if these effects of TLR4 are related to the

increased RAS activity in SHR, the following experiments were carried out using cultured VSMCs stimulated with Ang II.

Angiotensin II increases oxidative stress in VSMCs through TLR4 activation

In SHR VSMCs, Ang II (100 nM) incubation increased TLR4 mRNA levels from 15 min to 3 h (Fig. 7A), and this effect was reduced by preincubation with losartan (1 μ M, Fig. 7B), which indicates the involvement of AT₁ receptors in such induction.

It has been widely shown that Ang II increases ROS production thus contributing to the inflammatory process associated with hypertension [1,6,36]. Accordingly, in SHR VSMCs, Ang II (100 nM, 2 h) treatment increased NOX-1 and NOX-4 mRNA levels, while p22phox mRNA levels were unaffected (Fig. 8A); NOX-2 mRNA levels were scarcely detected (results not shown). In addition, Ang II also increased NAD(P)H oxidase activity and the subsequent superoxide anion production (Fig. 8B, C). The TLR4 antagonist CLI-095 did not affect NOX-1 mRNA levels; however, CLI-095 mitigated the increased NOX-4 mRNA levels, NAD(P)H activity and superoxide anion production induced by Ang II (Fig. 8A–C), which indicates a role for TLR4 in the increased oxidative stress induced by Ang II.

The ability of Ang II to induce cell migration and proliferation is well known [37]. The TLR4 inhibitor CLI-095 also reduced the increased cell migration and proliferation induced by Ang II (100 nM, 24 h, Fig. 9A, B), which suggests that TLR4 contributes to these effects.

In SHR VSMCs, the TLR4 antagonist CLI-095 alone did not modify any parameter studied (results not shown).

Discussion

The results of this study suggest that increased expression of TLR4, which is associated with increased RAS activity, contributes to the occurrence of hypertension. Additionally, this increased TLR4 expression is also involved in the previously described increased oxidative stress that most likely contributes to the endothelial dysfunction observed in hypertension.

TLR4 is expressed on the surface of different cell types including endothelial cells and VSMCs, and is involved in the recognition of and response to LPS, although many non-infectious endogenous TLR4 ligands also exist [4,20,21]. There is evidence regarding a role for the TLR4 signaling pathway and the innate immune response in the development of cardiovascular pathologies with an inflammatory component such as atherosclerosis [14], diabetes [26–28] and pre-eclampsia [29,30]. Hypertension has also been considered as a low-grade inflammatory disease, and growing evidence shows that the immune system is involved in the pathophysiology of hypertension [2–4]. In the present study, we found that TLR4 expression was increased in the three layers of the vascular wall of aortic segments as well as in cultured VSMCs from SHR compared with Wistar rats, suggesting that TLR4 from the endothelial and smooth muscle cells, and even from the adventitia, might contribute to the effects discussed below. The results are similar to that found in mesenteric resistance arteries from SHR [32] as well as in cardiomyocytes from both adult SHR and L-NAME-induced hypertensive rats [31]. Additionally, in peripheral monocytes from nondiabetic hypertensive patients, increased TLR4 gene expression has also been reported; antihypertensive treatment reduces that expression with a significant association with the systolic and diastolic blood pressure reduction [38]. Increased TLR4 levels in SHR can explain the enhanced vascular responses to LPS that we previously observed [7–9]. Furthermore, TLR4 expression seems to be

associated with the development/maintenance of hypertension because treatment of SHR with an anti-TLR4 antibody for 2 weeks reduced blood pressure, as previously described [32]. Accordingly, a recent report has shown that L-NAME failed to induce hypertension in TLR4^{-/-} mice [33]. Moreover, after the use of a neutralizing antibody *in vivo* in SHR, the heart rate was also reduced suggesting that the cardiac effects of TLR4 can contribute to the hypertensive action of this pathway. In this sense, it has been described that activation of the TLR4 in the brainstem via AT1R contributes to the sympathoexcitation drive in heart failure [39] and recently Dange et al. [40] has shown that brain TLR4 blockade improves cardiac function in Ang II-induced hypertensive rats.

RAS contributes to the vascular alterations associated with hypertension via its proinflammatory activity in the vascular wall, including the production of ROS, cytokines and prostanoids [1,6,36]. Furthermore, Ang II is able to induce the inflammatory response via the TLR4 pathway [13–19]; in addition, AT₁ receptor blockers (ARBs) reduce the LPS-induced innate immune response [41–43] and protect against myocardial ischemia-reperfusion injury through the TLR4/NF- κ B signaling pathway [44]. Accordingly, we found that Ang II increased TLR4 mRNA levels in SHR VSMCs via the AT₁ receptors, and treatment of SHR with losartan *in vivo* decreased the increased TLR4 levels found in this strain. These results suggest that the increased RAS activity observed in hypertension contributes to the increased TLR4 levels.

Hypertension is associated with functional vascular alterations such as endothelial dysfunction with impaired endothelium-dependent relaxations and increased vasoconstrictor responses. Endothelial dysfunction is a prognostic factor for cardiovascular events in patients with essential hypertension [45]. Our results demonstrate that the anti-TLR4 antibody treatment improved the vasodilator responses to acetylcholine in SHR. Additionally, the anti-TLR4 antibody reduced vasoconstrictor responses to phenylephrine, in agreement with results obtained in mesenteric resistance arteries [32]. Moreover, the increased phenylephrine response after endothelial denudation was greater in anti-TLR4 antibody-treated SHR. Altogether, this study suggests for the first time, to the best of our knowledge, that TLR4 contributes to the endothelial dysfunction observed in hypertension. In keeping with this, our group and others have previously shown that LPS administration induces endothelial dysfunction in both peripheral [46,47] and cerebral arteries [9]. Additionally, Liang et al. [48] reported that the *in vivo* and *in vitro* administration of LPS causes endothelial dysfunction in the arteries of wild-type mice, but not those of TLR4-mutated mice. The proposed role of TLR4 in endothelial dysfunction and the above mentioned increased TLR4 expression found in hypertensive animals can explain the greater impairment of bradykinin-induced relaxation elicited by LPS that was observed in the middle cerebral arteries of hypertensive rats [9].

One of the mechanisms that explain the endothelial dysfunction induced by TLR4 activation is the reduction of NO contribution to vascular responses. Accordingly, anti-TLR4 treatment improved endothelium-dependent relaxation, which in aorta is dependent on NO [49]; in addition, the L-NAME-induced contraction was greater in SHR aortic segments after anti-TLR4 antibody treatment, suggesting that this treatment might increase NO bioavailability. Augmented oxidative stress is one of the most generally accepted mechanism to explain the reduced NO bioavailability in hypertension [50,51]. There is evidence indicating that upon TLR4 activation, LPS increases the generation of ROS, such as O₂⁻ and H₂O₂, from NAD(P)H oxidase, and these

ROS are involved in NF- κ B activation and the subsequent expression of proinflammatory cytokines [22–25]. In the present study we found that the effect of antioxidants (apocynin, catalase and tiron) on both vascular contraction and relaxation disappeared after anti-TLR4 antibody treatment, suggesting that TLR4 contributes to the increased ROS production and endothelial dysfunction observed in hypertension. Accordingly, in obesity- and diabetes-associated endothelial dysfunction by increasing oxidative stress TLR4 plays a key role [48]. Recently, it was proposed that the greater ROS production caused by DAMPs release in L-NAME-induced hypertensive mice contributes to the vascular alterations found in this model [33]. TLR4 could also contribute to endothelial dysfunction by reducing NO production. Indeed, in cardiac microvascular endothelial cells, a reduction of eNOS expression and NO production via TLR4 signaling has been described under hypoxia/reoxygenation conditions [52]. However, we cannot discard COX-dependent mechanisms associated with TLR4 activation that might contribute to the vascular dysfunction associated with hypertension [32].

RAS plays an important role in increasing the oxidative stress present in hypertension [1,5,6,12,36]. In SHR VSMCs, the TLR4 antagonist mitigated the increased NOX-4 expression, NAD(P)H oxidase activity and superoxide anion production induced by Ang II. These results support the contribution of RAS-induced TLR4 in the oxidative stress observed in hypertension. Some authors have also described the role of TLR4 in the Ang II effects mediated by ROS production. Thus, after Ang II release, osteocalcin activates PKC/TLR4/ROS/COX-2, which mediates the transformation of fibroblasts to myofibroblasts [19]. Additionally, TLR4/MyD88-mediated oxidative stress is involved in Ang II-induced mesangial cell apoptosis [17].

Ang II induces VSMC proliferation and migration that contribute to the progression of many vascular diseases, including

hypertension [37]. Yuen et al. [19] have shown that the Ang II-induced migration of rat adventitial fibroblasts is mediated by TLR4 activation. Additionally, TLR4 contributes to the increased proliferation and migration induced by other stimuli [53,54]. Accordingly, the increased cell proliferation and migration induced by Ang II was reversed by TLR4 antagonists, thus suggesting that increased TLR4 expression is functionally associated with structural alterations that can also contribute to hypertension.

In conclusion, this study demonstrates, for the first time, that the increased RAS activity observed in hypertension stimulates the TLR4 pathway, contributing to the occurrence of hypertension. Additionally, by inducing oxidative stress, TLR4 leads to the endothelial dysfunction that is characteristic of this pathology. In recent years, several studies had demonstrated the role of adaptive immunity in the pathogenesis of hypertension [2,3]. Our results also suggest the impact of the TLR4 signaling pathway on the development of this inflammatory pathology and its associated vascular alterations. However, further investigations that deeply analyze the role of immunity in hypertension and end-organ damage will help develop therapies for this global disease.

Acknowledgments

The authors thank Ms. Olha Zhenyukh for her help in some of the experiments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RH DVV MS MJA. Performed the experiments: PRB RP AM CTM MASCS EMR AA. Analyzed the data: PRB RP AM AA. Wrote the paper: PRB RH DVV MS MJA.

References

- Savoia C, Schiffrin EL (2007) Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci* 112: 375–384.
- Schiffrin EL (2013) The immune system: role in hypertension. *Can J Cardiol* 29: 543–548.
- Schiffrin EL (2014) Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin Sci* 126: 267–274.
- McCarthy CG, Goulisoulou S, Wenceslau CF, Spiter K, Matsumoto T, et al. (2014) Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H184–H196.
- Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, et al. (2007) Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 381–388.
- Touyz RM, Briones AM (2011) Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res* 34: 5–14.
- Briones AM, Alonso MJ, Marin J, Salicrú M (1999) Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 126: 111–120.
- Briones AM, Alonso MJ, Marin J, Balagón G, Salicrú M (2000) Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 131: 185–194.
- Hernanz R, Briones AM, Alonso MJ, Vila E, Salicrú M (2004) Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H225–H234.
- Blagat K, Vallance P (1997) Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 96: 3042–3047.
- García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AL, Alonso MJ, Simonsen U, et al. (2009) Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther* 328: 19–27.
- Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, et al. (2013) Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 18: 51–65.
- Wolf G, Böhlender J, Bondeva T, Roger T, Thais F, et al. (2006) Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 17: 1585–1593.
- Otsui K, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Honjo T, et al. (2007) Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. *Heart Vessel* 22: 416–422.
- Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N (2009) Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 23: 265–276.
- Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N, Gou W (2009) PPAR γ agonist, rosiglitazone, regulates angiotensin II-induced vascular inflammation through the TLR4-dependent signaling pathway. *Lab Invest* 89: 887–902.
- Lu J, Jia R, Yang D, Zhu J, Ding G (2009) Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 81–86.
- Wu J, Yang X, Zhang YF, Zhou SF, Zhang R, et al. (2009) Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells. *Inflamm Res* 58: 473–482.
- Yuen CY, Wong SL, Lau CW, Isang SY, Xu A, et al. (2012) From skeleton to cytoskeleton: osteocalcin transforms vascular fibroblasts to myofibroblasts via angiotensin II and Toll-like receptor 4. *Circ Res* 111: e55–66.
- Isan MF, Gao B (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76: 514–519.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373–384.
- Aschnoun K, Strassheim D, Mitra S, Kim JY, Abraham E (2004) Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF- κ B. *J Immunol* 172: 2522–2529.
- Ryan KA, Smith MF Jr, Sanders MK, Ernst PB (2004) Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF- κ B and interleukin-8 expression. *Infect Immun* 72: 2125–2130.
- Park HS, Chun JN, Jung HY, Choi C, Bae YS (2006) Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res* 72: 447–455.
- Pacquet S, Johnson JL, Ellis BA, Brzezinska AA, Lane WS, et al. (2007) Crosstalk between IRAK-4 and the NADPH oxidase. *Biochem J* 403: 451–461.

26. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffin SC, et al. (2008) Increased Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with Type 1 Diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 578–583.
27. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I (2010) Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33: 861–868.
28. Xie BG, Jin S, Zhu WJ (2014) Expression of toll-like receptor 4 in maternal monocytes of patients with gestational diabetes mellitus. *Exp Ther Med* 7: 236–240.
29. Kim YM, Romero R, Oh SY, Kim CJ, Kilburn BA, et al. (2005) Toll-like receptor 4: a potential link between "danger signals," the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol* 193: 921–927.
30. Pineda A, Verdín-Lerán SL, Camacho A, Moreno-Fierros L (2011) Expression of Toll-like Receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 is increased in placentas from patients with preeclampsia. *Arch Med Res* 42: 382–391.
31. Eißler R, Schmaderer C, Rusai K, Kühne L, Sollinger D, et al. (2011) Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity. *Hypertens Res* 34: 551–558.
32. Bomfim GF, Dos Santos RA, Oliveira MA, Giachini FR, Akamine EH, et al. (2012) Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 122: 535–543.
33. Sollinger D, Eißler R, Lorenz S, Strand S, Chmielewski S, et al. (2014) Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signalling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension. *Cardiovasc Res* 101: 464–472.
34. Xavier FE, Davel AP, Rossoni LV, Vassallo DV (2003) Time-dependent hyperactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanooids and calcium mobilization. *Vascul Pharmacol* 40: 67–76.
35. Martín A, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Palacios R, Briones AM, et al. (2012) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J Hypertens* 30: 315–326.
36. Virdis A, Duranti E, Taddei S (2011) Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens* 2011: 916310.
37. Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82–C97.
38. Markatou ME, Kontaraki JE, Zacharis EA, Kochiadakis GE, Giaouzi A, et al. (2012) TLR2 and TLR4 gene expression in peripheral monocytes in nondiabetic hypertensive patients: the effect of intensive blood pressure-lowering. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 14: 330–335.
39. Ogawa K, Hirooka Y, Kishi I, Sunagawa K (2011) Brain AT₁ receptor activates the sympathetic nervous system through toll-like receptor 4 in mice with heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 58: 543–549.
40. Dange RB, Agarwal D, Masson GS, Vila J, Wilson B, et al. (2014) Central blockade of TLR4 improves cardiac function and attenuates myocardial inflammation in Angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res* 103: 17–27.
41. Sánchez-Lemus E, Benicky J, Pavel J, Larrayoz IM, Zhou J, et al. (2009) Angiotensin II AT₁ blockade reduces the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat spleen. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R1376–R1384.
42. Sánchez-Lemus E, Murakami Y, Larrayoz-Roldán IM, Moughamian AJ, Pavel J, et al. (2008) Angiotensin II AT₁ receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland. *Endocrinology* 149: 5177–5188.
43. Dasu MR, Riewe-lasco AC, Jialal I (2009) Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 202: 76–83.
44. Yang J, Jiang H, Yang J, Ding J-W, Chen L-H, et al. (2009) Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through TLR4/NF κ B signalling pathway. *Mol Cell Biochem* 330: 39–46.
45. Pericone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, et al. (2001) Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 104: 191–196.
46. Brandes RP, Koldenbergs G, Gwinner W, Kim DY, Kruse HJ, et al. (1999) Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension* 33: 1243–1249.
47. Pleiner J, Mittermayer F, Schaller G, MacAllister RJ, Wolz M (2002) High doses of vitamin C reverse Escherichia coli endotoxin-induced hyperactivity to acetylcholine in the human forearm. *Circulation* 106: 1460–1464.
48. Liang CF, Liu JJ, Wang Y, Xu A, Vanhoutte PM (2013) Toll-Like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH Oxidase isoforms 1 and 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 777–784.
49. Freitas MR, Schott C, Corriu C, Sassard J, Stocket JC, et al. (2003) Heterogeneity of endothelium-dependent vasorelaxation in conductance and resistance arteries from Lyon normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens* 21: 1505–1512.
50. Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: 840–844.
51. Schulz E, Gori T, Münzel T (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 34: 665–673.
52. Zhang Z, Li W, Sun D, Zhao L, Zhang R, et al. (2011) Toll-like receptor 4 signaling in dysfunction of cardiac microvascular endothelial cells under hypoxia/reoxygenation. *Inflamm Res* 60: 37–45.
53. de Graaf R, Kloppenburg G, Kitslaar PJ, Bruggeman CA, Stassen F (2006) Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. *Microbes Infect* 8: 1859–1865.
54. Pi Y, Zhang LL, Li BH, Guo L, Cao XJ, et al. (2013) Inhibition of reactive oxygen species generation attenuates TLR4-mediated proinflammatory and proliferative phenotype of vascular smooth muscle cells. *Lab Invest* 93: 880–887.

9 ANEXO II

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UAM



CEI-31-759

COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, en su reunión del día veintisiete de febrero de dos mil doce, ha considerado las circunstancias que concurren en el proyecto de investigación "*Hipertensión y regulación recíproca de especies reactivas de oxígeno y protanoides a nivel vascular. Papel de la vía angiotensina II/TLR4 en la producción de ambos mediadores*" que tiene como investigadora principal a la Dra. Mercedes Salaces Sánchez.

A la vista de la documentación presentada este Comité ha acordado **informar favorablemente** el proyecto de investigación, ya que cumple los requisitos éticos requeridos para su ejecución.

Y para que así conste lo firmo en Madrid a treinta de abril de dos mil doce.

Isabel Martínez Cabañas
Secretaria CEI

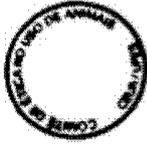


Nuria Fernández Monsalve
Presidenta CEI

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFES



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 042/2013, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Participação do receptor TLR4 no aumento de mediadores inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio na hipertensão arterial.**", que tem como responsável o (a) docente **Dalton Valentin Vassalo**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 06/09/13.

Vitória (ES), 06 de setembro de 2013.

Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA-UFES