CINTHYA ECHEM

PARTICIPAÇÃO DO TLR4 NO PROCESSO DE REMODELAMENTO CARDÍACO DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS - SHR

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

CINTHYA ECHEM

PARTICIPAÇÃO DO TLR4 NO PROCESSO DE REMODELAMENTO CARDÍACO DE RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS - SHR

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

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

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

reprodução não autorizada pelo autor

Pereira, Cinthya Echem de Souza.

Participação do TLR4 no processo de remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos / Cinthya Echem de Souza Pereira. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Hipertensão Arterial Sistêmica.

Versão do título para o inglês: Role of TLR4 in cardiac remodeling process of spontaneously hypertensive rats.

Hipertensão
 Hipertrofia ventricular esquerda
 Receptores imunológicos
 Carvalho, Profa. Dra. Maria Helena Catelli de II.
 Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
 Título.

ICB/SBIB0181/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Cinthya Echem de Souza Pereira.	
Título da Disserta	ção: Participação do TLR4 no processo de remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos.	
Orientador(a):	Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho.	
em sessão pú	algadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, ablica realizada a	
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:	
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:	
Presidente:	Assinatura:	



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

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

São Paulo, 08 de dezembro de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador CEUA - ICB/USP Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER

Secretário-suplente CEUA – ICB/USP



Aos meus amores Suzan, Caio e Mauro, por todo amor, carinho, dedicação e companheirismo. Sem vocês nada disso faria sentido.

AGRADECIMENTOS

"Bons amigos – Machado de Assis
Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir.
Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!
Benditos os que sofrem por amigos, os que falam com o olhar.
Porque amigo não se cala, não questiona, nem se rende. Amigo a gente entende!
Benditos os que guardam amigos, os que entregam o ombro pra chorar.
Porque amigo sofre e chora. Amigo não tem hora pra consolar!
Benditos sejam os amigos que acreditam na tua verdade ou te apontam a realidade.
Porque amigo é a direção. Amigo é a base quando falta o chão!
Benditos sejam todos os amigos de raízes, verdadeiros.
Porque amigos são herdeiros da real sagacidade.
Ter amigos é a melhor cumplicidade!"

À minha orientadora Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho, obrigada por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório e em seu grupo de pesquisa, por ter acreditado em meu potencial, por toda a sua ajuda, por todos os ensinamentos, por todos os conselhos, por me proporcionar um excelente ambiente de trabalho e sobre tudo por tornar possível a realização de meu sonho.

À Gisele Facholi Bomfim por me permitir fazer parte de seu trabalho, por todos os ensinamentos e conselhos, pelas palavras de apoio quando os experimentos deram errado e pela convivência e amizade dentro e fora do laboratório.

À Dra. Zuleica Bruno Fortes por todos os ensinamentos e por me permitir fazer parte de sua equipe e usufruir da infraestrutura do seu laboratório.

Às Dras. Eliana Akamine e Graziela Ceravolo por toda atenção, por todos os ensinamentos e conselhos nos momentos mais necessários, pelo auxílio com os experimentos e pela convivência e amizade dentro e fora do laboratório.

Ao Dr. Paulo Saldiva e a Dra. Mariana Matera, por aceitarem fazer uma parceria, pelos ensinamentos e pela confecção excelente do material histológico.

Aos professores Dr. Joel Heimann, Dra. Silvia Lacchini, Dr. Antônio Carlos de Oliveira, Dr. Marcus Vinícius Baldo e Dr. Cristoforo Scavone, pelas excelentes disciplinas ministradas durante a minha formação.

Aos técnicos de laboratório e amigos Maria Aparecida de Oliveira, Rosangela dos Santos Eichler e Antônio Garcia, pelos ensinamentos, por todo auxílio nos experimentos, pela paciência, pela amizade e por todos os momentos agradáveis dentro e fora do laboratório.

Aos técnicos de laboratório e amigos Marta Rodrigues, Sônia Leite, Ana Rita Araújo, Manoel Rocha, Maria Alice Araújo, Sandra Silva e Manoel Messias, por todo auxílio, por todas as risadas, pela amizade e convivência dentro e fora do laboratório.

Aos meus queridos amigos de laboratório Tiago Januário, Vanessa Oliveira, Beatriz Ponzio, Simone Sartoretto, Eveline Fonseca, Priscila Xavier, Graziela Neves, Veronica Rennó, Luciana Giaquinto, Clara Martins, Carolina Midori, Paula Honda, Núbia Lobato, Fernando Filgueira, por todos os ensinamentos, pela amizade, pelas conversas, pelas risadas e pela inesquecível convivência dentro e fora do laboratório.

As amigas da secretaria Julieta Santos, Selma Rigonati, Camila Trindade e Mônica Nunes pelo auxílio com a papelada, pela amizade, pelas risadas e pela excelente convivência dentro e fora do laboratório.

Ao querido amigo Dr. Luiz Jorge Fagundes, por acreditar em meu potencial e me abrir a primeira porta para que eu pudesse trilhar o meu sonho, por todo carinho, por todos os conselhos e pelo exemplo de profissional.

À minha mãe Suzan Echem, meu irmão Caio César Echem e meu amor Mauro Terralavoro, pelo amor incondicional, por serem meus maiores fãs, por todo apoio, por todo incentivo, por vibrarem comigo cada vitória e pelo abraço compreensivo em cada derrota, pelo aconchego de casa, pela inspiração, pela confiança, por serem meu chão e meu céu, obrigada por tudo!

Aos meus avós Walkyria Barbosa de Mello, Ruth Rosa Pereira e Osvaldo de Souza Pereira, aos meus tios Wlademir Echem Júnior, Lia Mara Orlando e Hosana de Souza Pereira, a minha prima Ananda Cristine Sarno e minha cunhada Juliana Desidério, por todo amor, por todo carinho, por todos os momentos de alegria e por todo apoio sempre.

À família Terralavoro, Netina, Renato, Renata, Steven, Luca, Elena, Marisa, Ivany, Karina, Marcos, Silvia, Reginaldo e Denise, por me receberem de braços abertos em sua família, por todo amor, pelo carinho, pelos conselhos, pelo apoio e incentivo.

Às minhas queridas amigas Débora Oliveira, Márcia Oliveira e Anelise Pavão, pelo presente da amizade, por todo o amor, por todas as risadas e pelo ombro no momento necessário, pela certeza de que amigos também são irmãos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro com a bolsa de mestrado e de reserva técnica, me permitindo desta forma desenvolver a minha pesquisa ao longo destes dois anos.

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

"Sabemos como é a vida: num dia dá tudo certo e no outro as coisas já não são tão perfeitas assim. Altos e baixos fazem parte da construção do nosso caráter. Afinal, cada momento, cada situação, que enfrentamos em nossas trajetórias é um desafio, uma oportunidade única de aprender, de se tornar uma pessoa melhor. Só depende de nós, das nossas escolhas... Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande da forma que eu gostaria, saber que já não sou o mesmo de ontem me faz perceber que valeu a pena."

(Albert Einstein)

RESUMO

ECHEM, C. Participação do TLR4 no processo de remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos - SHR. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O remodelamento cardíaco é uma sequela comum da hipertensão arterial (HA). Sabe-se que na HA há presença de processo inflamatório crônico de baixa intensidade e que este pode contribuir para o desenvolvimento e progressão do remodelamento cardíaco. Receptores do tipo Toll (TLRs) são receptores da imunidade inata, cuja ativação induz a produção de moléculas inflamatórias. Estudos recentes relacionam TLRs e doenças cardiovasculares, evidenciando principalmente o TLR4, entretanto pouco se sabe sobre sua participação no remodelamento cardíaco. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do TLR4 no processo de remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos -SHR. Para isso, foram utilizados ventrículos esquerdos de SHR e Wistar com 6 e 21 semanas de idade. Primeiramente observamos que com o desenvolvimento da HA há aumento nos níveis cardíacos de TLR4, pois SHR com 21 semanas (hipertensos) apresentam maiores níveis de RNAm do TLR4 em relação aos dos SHR com 6 semanas (pré-hipertensos) e dos Wistar com 6 e 21 semanas de idade (normotensos). Tendo isto em vista, em outro grupo experimental animais SHR e Wistar com 19 semanas de idade foram tratados com anticorpo anti-TLR4, por quinze dias via intraperitoneal, com o intuito de bloquear a ativação deste receptor. Animais SHR e Wistar controles foram tratados com anticorpo IgG inespecífico, com o intuito de descartar qualquer ação inespecífica do anticorpo anti-TLR4. Após o tratamento com anti-TLR4, observamos que houve redução da área e do diâmetro dos cardiomiócitos, bem como da deposição de colágeno em ventrículo esquerdo dos SHR tratados com anti-TLR4 em relação aos SHR IgG, no entanto, nenhuma alteração foi observada entre os animais Wistar tratados com anti-TLR4 e com IgG. Observamos também que não houve nenhuma alteração nos valores pressóricos após o tratamento com anti-TLR4. É importante ressaltar que em virtude desses resultados acima descritos não serem observados em Wistar, foi avaliada somente a sinalização envolvida na redução do remodelamento cardíaco em SHR, uma vez que estes animais não apresentaram redução nos níveis pressóricos após tratamento com anti-TLR4. Desta forma, observamos que após tratamento com anti-TLR4, animais SHR apresentaram redução nos níveis de RNAm dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP (peptídeo natriurético atrial), BNP (peptídeo natriurético cerebral) e α-actina esquelética, bem como dos colágenos tipo I e III e das metaloproteinases 2 e 9 em relação aos SHR IgG. Além disso, observamos também redução nos níveis de RNAm e expressão protéica do TLR4 e MyD88, bem como da expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β dos SHR anti-TLR4 em relação aos SHR IgG. Esses resultados em conjunto sugerem que os TLR4 participam diretamente do remodelamento ventricular esquerdo de espontaneamente hipertensos - SHR adultos.

Palavras-chave: Hipertensão arterial. Remodelamento cardíaco. Receptores do tipo Toll 4.

ABSTRACT

ECHEM, C. Role of TLR4 in cardiac remodeling process of spontaneously hypertensive rats - SHR. 2012. 64 p. Master thesis (Farmacology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The cardiac remodeling is a common consequence of hypertension. It is known that in hypertension there is a chronic inflammation which contributes to the development of cardiac remodeling process. Toll-like receptors (TLRs) are innate immunity receptors and its activation induces production of inflammatory molecules. Recent studies showed the involvement of TLRs in cardiovascular disease development, especially TLR4, however the involvement in cardiac remodeling is unknown. Therefore, the aim of this study was to evaluate the involvement of TLR4 in the cardiac remodeling process of spontaneously hypertensive rats - SHR. For this, the left ventricles were removed from SHR and Wistar with 6 and 21 weeks-old. It was demonstrated that with development of hypertension an increase in the cardiac levels of TLR4 was observed in adults SHR 21 weeks-old (hypertensive) related to SHR 6 weeks-old (pré-hypertensive) and Wistar 6 and 21 weeks-old (normotensive). In order to block the activation of TLR4, SHR and Wistar with 19 weeks-old were treated with anti-TLR4 antibody, for fifteen days intraperitoneal. In another set of experiments SHR and Wistar adult rats were treated with nonspecific IgG antibody to rule out any nonspecific actions of anti-TLR4 antibody. A reduction of area and cardiomyocyte diameter and collagen deposition in the left ventricle of SHR were observed after anti-TLR4 treatment compared to SHR IgG, however no change was observed in Wistar rats. It was also demonstrated that anti-TLR4 treatment has no effect on the adults SHR blood pressure. Is important to note that the signaling involved in the reduction of cardiac remodeling was evaluated only in adults SHR. A reduction in mRNA levels of ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain natriuretic peptide) and α-skeletal actin, a cardiac hypertrophy markers, as well as collagen type I and III and metalloproteinases 2 and 9 were observed after SHR anti-TLR4 treatment. Furthermore, it also observed a reduction in the mRNA levels and protein expression of TLR4 and MyD88, as well as the protein expression of proinflammatory cytokines TNF-α and IL-1β in adults SHR after anti-TLR4 treatment. Taking all together, these results allow us suggest that TLR4 is involved in the left ventricular remodeling of adults spontaneously hypertensive rats - SHR.

Keywords: Hypertension. Cardiac remodeling. Toll like receptor 4.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema ilustrando as principais vias de sinalização ativadas pelo TLR4
na célula28
Figura 2 - Níveis de RNAm do TLR4 em ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com
6 e 21 semanas de idade39
Figura 3 - Área (A), diâmetro (B) e figuras ilustrativas (C) de cardiomiócitos de
ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento
com anti-TLR4 ou IgG inespecífico40
Figura 4 - Deposição de colágeno (A) e figuras ilustrativas (B) de ventrículo
esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anti-
TLR4 ou IgG inespecífico42
Figura 5 - Pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) de SHR e Wistar
com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico43
Figura 6 - Níveis de RNAm dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP (A), BNP
(B) e α -actina esquelética (C) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de
idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico44
Figura 7 - Níveis de RNAm dos colágenos tipo I (A) e tipo III (B) em ventrículo
esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG
inespecífico45
Figura 8 - Níveis de RNAm das metaloproteinases tipo 2 (A) e tipo 9 (B) em
ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-
TLR4 ou IgG inespecífico46
Figura 9 - Níveis de RNAm (A) e expressão protéica (B) do TLR4 em ventrículo
esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG
inespecífico47
Figura 10 - Níveis de RNAm (A) e expressão protéica (B) da molécula adaptadora
MyD88 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento
com anti-TLR4 ou IgG inespecífico48
Figura 11 – Expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A), IL-1 β (B)
e IL-6 (C) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após
tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos do TLR4, do MyD88, dos colágenos I e III,	das
metaloproteinases 2 e 9, dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP, BNP e	alfa
actina esquelética e do padrão normalizador β-actina	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA Análise de variância

ANP Atrial natriuretic peptide

BNP Brain natriuretic peptide

BCA Ácido bicincônínico

cDNA Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA Comissão Experimental no Uso de Animais

COX Ciclooxigenase

CpG Citosina precedendo guanina

DAMPs Damage associated molecular pathern

DCVs Doenças cardiovasculares

DDCt Delta-Delta Ct

DTT Ditiotreitol

DNA Ácido desoxirribonucleico

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

epm Erro padrão da média

ERK1/2 Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2

EUA Estados Unidos da América

g Gramas

HA Hipertensão arterial
HSP Heat Shock Protein
IC Insuficiência cardíaca

ICAM Molécula de adesão intercelular ICB Instituto de Ciências Biomédicas

IECA Inibidor da enzima conversora de angiotensina

IgG Imunoglobulina G

IKK IKB kinase
IL Interleucina

IM Infarto do miocárdio

IRAK Interleukin-1 receptor associated kinase
IRF Interferon regulatory transcription factor

kg Kilograma

LDL Lipoproteína de baixa densidade

L-NAME Éster de N-metil-L-arginina

LPS Lipopolissacarídeo

MAL MyD88-adaptador like

MAPK Proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1 Proteína quimiotática de monócitos

mg Miligrama

mL Mililitro

μM Micrômetro mM Milimolar

mmHg Milímetros de mercúrio

MMP Metaloproteinase

MyD88 Myeloid differentiation primary response gene 88

NF-kB Nuclear Factor-KappaB

PA Pressão arterial

PAMP Pathogen associated molecular patherns

PCR Proteína C reativa

PMSF Fluoreto de fenilmetil-sulfonil

PN Peptídeo natriurético

RNA Ácido ribonucleico

RNAm Ácido ribonucleico mensageiro

RPM Rotações por minuto

SARM Sterile-α and heat-armadillo motif protein

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório

SDS Dodecil sulfato de sódio

SHR Ratos espontaneamente hipertensos

SUS Sistema Único de Saúde

TAB TAK binding protein

TAK TGF-β activeted kinase

TBS-T Tris buffer saline + Tween-20

TGF Transforming growth fator

TIMP Inibidor de metaloproteinase

TIR Toll-interleukin-1 receptor homology

TIRAP TIR-associated protein

TLR Toll like receptors

TNF- α Fator de necrose tumoral α

TNFR Receptor de fator de necrose tumoral α

TRAF TNF receptor associated fator

TRAM Toll receptor associated molecule

TRIF Toll receptor activeted interferon

tRNA Ácido Ribonucleico total

U Unidades

UA Unidades arbitrárias

USP Universidade de São Paulo

VCAM Molécula de adesão vascular

V Volts

vs Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Hipertensão arterial e remodelamento cardíaco	19
1.2 Remodelamento cardíaco e inflamação	22
1.3 Receptores do tipo Toll	26
2 OBJETIVO	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Tratamento com anticorpo anti-TLR4	32
3.3 Grupos experimentais	32
3.4 Níveis de RNAm pela técnica de Reação em Cadeia da Polimeras	e em
Tempo Real (RT-PCR)	33
3.5 Análises histológicas em ventrículo esquerdo	34
3.6 Medidas hemodinâmicas (pressão arterial direta e frequência cardíaca)	36
3.7 Expressão protéica pela técnica de Western Blotting	36
3.8 Análise estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Níveis de RNAm do TLR4 em ventrículo esquerdo de ratos SHR e V	/istar
com 6 e 21 semanas de idade	39
4.2 Área e diâmetro de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de SHR e W	/istar
com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou	ı lgG
inespecífico	39
4.3 Deposição de colágeno em ventrículo esquerdo de SHR e Wistar co	m 21
semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou	lgG
inespecífico	41
4.4 Níveis Pressóricos (pressão arterial média e frequência cardíaca) de S	HR e
Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLF	≀4 ou
IgG inespecífico	43
4.5 Níveis de RNAm dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP, BNP e	alfa
actina esquelética em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de i	dade
anós tratamento com anticorno anti-TI R4 ou IgG inespecífico	44

4.6 Níveis de RNAm dos colágenos tipo I e tipo III em ventrículo es	squerdo de
SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo ar	nti-TLR4 ou
lgG inespecífico	45
4.7 Níveis de RNAm das metaloproteinases tipo 2 e tipo 9 em	ventrículo
esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento con	n anticorpo
anti-TLR4 ou IgG inespecífico	46
4.8 Níveis de RNAm e expressão protéica do TLR4 em ventrículo es	squerdo de
SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo ar	nti-TLR4 ou
lgG inespecífico	47
4.9 Níveis de RNAm e expressão protéica da molécula adaptadora	MyD88 em
ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após trata	mento com
anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico	48
4.10 Expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1	β e IL-6 em
ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após trata	mento com
anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico	49
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial e remodelamento cardíaco

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial de alta prevalência, caracterizada por elevados e sustentados níveis de pressão arterial (PA), com pressão diastólica maior ou igual a 90 mmHg e pressão sistólica maior ou igual a 140 mmHg (1, 2). Cerca de um quarto da população adulta, ou seja, aproximadamente 1 bilhão de pessoas no mundo são hipertensas e estima-se que até 2025 ocorra aumento de até 29% na prevalência desta condição (3).

Quando crônica, a HA está associada a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, tais como, coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, contribuindo assim, para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs). Sendo assim, é importante ressaltar que além de uma alta prevalência, a HA é considerada um dos principais problemas de saúde pública, pois a mortalidade por DCVs aumenta progressivamente com o aumento da PA. No Brasil, as DCVs têm sido consideradas as principais causas de morte, como exemplo, em 2007 mais de 300 mil óbitos foram atribuídos a doenças do aparelho circulatório (1). As DCVs são responsáveis também por alta frequência de internações, cujos custos médicos e socioeconômicos são bastante elevados. Em 2007 foram registradas mais de 1 milhão de internações por DCVs no Sistema Único de Saúde (SUS) e em novembro de 2009 foram gastos mais de R\$ 165 milhões devido a estas internações (4).

Dentre os fatores envolvidos na fisiopatogênese da HA, grande parte é atribuída a fatores genéticos, porém até o presente momento ainda não há variantes genéticas que possam ser utilizadas para prever o risco individual de desenvolvimento de HA. Sendo assim, a HA primária ou essencial, acomete aproximadamente 95% da população hipertensa. Dentre os modelos animais de HA, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são os que mais se aproximam da HA primária encontrada no homem. Estes animais, à partir de 6 semanas de idade, começam a desenvolver um quadro hipertensivo e com o desenvolvimento da HA, estes animais desenvolvem também um progressivo quadro de remodelamento cardíaco (1, 5-7).

O remodelamento cardíaco é uma sequela comum da HA, sendo que este é inicialmente um mecanismo adaptativo do coração em resposta ao aumento de sua

atividade, da sobrecarga funcional ou do estresse da parede ventricular, com o objetivo de manter a função cardíaca, porém a cronicidade desse processo consiste em um importante risco de morbidade e mortalidade cardiovascular por acarretar em arritmias ventriculares e insuficiência cardíaca (7-9).

O processo de remodelamento cardíaco está associado à disfunção cardíaca e por muito tempo esta disfunção foi associada a alterações miocárdicas, no sentindo de encontrar nos miócitos todas as explicações para a disfunção ventricular, porém com o desenvolvimento de estudos observou-se a participação de outros componentes neste processo. Sendo assim, a disfunção ventricular deixou de ser associada exclusivamente ao crescimento muscular e passou a ser atribuída ao conjunto de alterações envolvendo os compartimentos muscular, vascular e intersticial, com hipertrofia dos cardiomiócitos, fibrose perivascular, fibrose intersticial e modificações de padrões de expressões gênicas, moleculares e celulares que se manifestam clinicamente com alterações do tamanho, peso, forma e/ou função do coração após uma injúria (10, 11).

Os miócitos cardíacos são células com capacidade de divisão muito restrita na vida adulta. Estima-se que no recém-nascido até 2% dos miócitos sejam capazes de se dividir, porém ao final do primeiro mês de vida, menos de 1% dos miócitos mantém esta capacidade, ocorrendo o que é denominado de perda do potencial proliferativo, sendo assim, o aumento de massa miocárdica em doenças cardíacas se dá pela hipertrofia (12, 13).

De modo geral, a hipertrofia cardíaca pode ser considerada como concêntrica ou excêntrica. A sobrecarga pressórica desencadeia a hipertrofia concêntrica, que é caracterizada por aumento da espessura das paredes ventriculares, redução dos diâmetros cavitários e adição de sarcômeros em paralelo, o que leva ao aumento do diâmetro e da área total dos cardiomiócitos (7).

A síntese protéica é imprescindível para que ocorra a hipertrofia ventricular. O aumento do estresse na parede cardíaca é provavelmente o principal mecanismo desencadeador de síntese protéica. Na célula, o estresse da parede é representado pelo estiramento do sarcômero, pelo aumento da tensão na superfície celular e pela ativação de receptores de membrana, sendo que a partir destes estímulos, ocorre a promoção de diversos sinais intracitoplasmáticos, que traduzem a mensagem de estiramento em síntese protéica e multiplicação de organelas celulares (13).

Uma das primeiras modificações celulares presentes na hipertrofia cardíaca é a síntese de mitocôndrias, provavelmente para fornecer maior quantidade de energia para o tecido em crescimento. Além disso, a sobrecarga hemodinâmica reativa genes de proteínas contráteis e não contráteis presentes no coração fetal, mas sem expressão no coração adulto normal, como a alfa actina esquelética, o peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP) (11, 13, 14).

De modo geral, esses genes participam da homeostase cardiovascular e modulam o crescimento celular no coração fetal, porém a razão para o aumento de suas expressões no coração adulto ainda não é totalmente esclarecida, mas suspeita-se que o retorno ao padrão fetal possa ser explicado por sua maior resistência à hipóxia celular, pois tanto no coração hipertrofiado como no coração fetal, os cardiomiócitos toleram baixas tensões de oxigênio. Sendo assim, esses genes são amplamente utilizados como marcadores de hipertrofia cardíaca (13).

Os peptídeos natriuréticos (PNs) induzem a vasodilatação, aumentam a diurese e inibem a produção de renina e aldosterona, possuindo assim, papel importante na regulação da pressão arterial e volume sanguíneo (15). O ANP representa cerca de 98% dos peptídeos natriuréticos presentes na circulação e é sintetizado principalmente pelo átrio, já o BNP principalmente pelos ventrículos (15, 16). No coração adulto normal, o ventrículo produz apenas uma pequena concentração desses peptídeos, porém uma maior concentração é produzida em corações submetidos a estresse miocárdico e/ou hipertensão arterial (16).

Apesar dos miócitos representarem 75% do volume celular miocárdico, o número de células é pequeno quando comparado ao número de fibroblastos, que representam mais de 70% do número de células no coração. Além disto, este tecido é composto também por outras estruturas, como vasos, nervos, substâncias amorfas e tecido conectivo, sendo este último composto principalmente por colágeno. (7, 11, 17). Estudos mostram que há associação direta entre a intensidade de deposição de colágeno miocárdico e o peso de corações hipertrofiados, sugerindo que a fibrose é mais pronunciada quanto mais intensa for a hipertrofia cardíaca (7, 18).

No coração pode-se encontrar os colágenos tipo I, III, IV, V e VI, sendo que os colágenos tipo I e III representam os principais colágenos cardíacos. O colágeno tipo I constitui cerca de 80% do colágeno cardíaco, é o mais rígido de todos e o principal responsável pela rigidez da câmara cardíaca como um todo. Já o colágeno tipo III constitui cerca de 12% do colágeno cardíaco, formando agregados mais finos do

que o tipo I e exercendo papel importante na manutenção do alinhamento dos feixes de miócitos (7).

A quantidade de colágeno na matriz cardíaca depende do equilíbrio entre síntese e degradação, sendo que a degradação dessas estruturas ocorre pela ação de enzimas do grupo das metaloproteinases (MMPs) (7). Estas enzimas encontram-se na forma inativa, podendo ser ativadas por diversos estímulos, como mecânicos, isquêmicos ou moleculares, como angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral (TNF-α), interleucina 1 (IL-1), dentre outros (19).

As MMPs desenvolvem papel importante em processos fisiológicos, como embriogênese, angiogênese, metástase, inflamação, artrites, além da capacidade de remodelamento da matriz extracelular (20, 21). A ativação dessas enzimas e consequente quebra da rede de colágeno interfibrilar podem ter inúmeras consequências na arquitetura e função ventricular (19). Sendo assim, tanto o aumento da deposição do colágeno, como o aumento de sua degradação, implicam em disfunção ventricular (11, 22, 23).

1.2 Remodelamento cardíaco e inflamação

Estudos demonstram que há forte relação entre HA, DCVs e processo inflamatório (24, 25). De fato, diversos estudos envolvendo tanto pacientes, quanto animais hipertensos têm demonstrado que estes possuem níveis plasmáticos aumentados de algumas moléculas inflamatórias, como proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral (TNF-α), interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8), moléculas de adesão vascular (VCAM-1) e intercelular (ICAM-1), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), angiotensina II, proteínas do choque térmico 60 (HSP60) e 70 (HSP70), aumento de espécies reativas de oxigênio e ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NF-κB), dentre outras (25).

Em condições normais, as células reconhecem a presença de injúria e ativam o sistema imune, que imediatamente ativa uma resposta inflamatória. Esta resposta inflamatória visa remover células mortas e restos de matriz, além de reparar danos teciduais através da fibrogênese ou regeneração tecidual, restaurando as estruturas e funções originais dos órgãos (26, 27). Apesar disso, a resposta inflamatória prolongada induz a deposição de matriz extracelular e crescimento de tecido granular e conectivo, o que pode ser deletério para o órgão (25).

No coração, a HA pode causar injúria cardíaca, acarretando em infiltração de células inflamatórias, sendo elas os neutrófilos, macrófagos e monócitos. O aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e diminuição das anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) gera estresse oxidativo que consequentemente ativa a apoptose celular e degradação da rede de colágeno miocárdico. Além disso, o aumento da liberação de citocinas pró-fibróticas como o TGF-β (fator de transformação do crescimento), acarreta em estimulação de fibroblastos e miofibroblastos que medeiam a síntese e deposição de colágeno, contribuindo assim, para o desenvolvimento de fibrose cardíaca (28, 29). É importante ressaltar que tanto o aumento da deposição do colágeno, como o aumento de sua degradação, implicam em disfunção ventricular. Além disso, já foi descrito também que fragmentos de colágeno podem exercer potentes efeitos pró-inflamatórios (11, 22, 23, 30).

O processo inflamatório pode contribuir também para o desenvolvimento e progressão de outras DCVs, como aterosclerose, insuficiência cardíaca (IC), infarto do miocárdio (IM), angina, miocardite, dentre outras (31-35). Há evidências de que a inflamação está envolvida com o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, pois inicialmente há recrutamento local de monócitos e macrófagos para quebra da placa de ateroma, porém isso gera quadro inflamatório que quando crônico pode ser prejudicial para o tecido (36). Estudos demonstram também que há correlação positiva entre os níveis de moléculas pró-inflamatórias, como PCR, IL-1β, IL-6 e TNF-α, com o grau de IC (37-41).

Diversos estímulos podem acarretar na produção de citocinas pró-inflamatórias. Elas são produzidas principalmente por macrófagos e células T, porém podem também serem produzidas por outras células inflamatórias, bem como por células vasculares, cardiomiócitos e adipócitos. Embora a quantidade e a função das citocinas pró-inflamatórias sejam diversas, muitas partilham mecanismo de ativação comum, pois são produzidas na forma inativa, sofrem clivagem enzimática e tornamse ativas, podendo regular a expressão e função de proteínas, como moléculas de adesão, componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento (25, 42). Além disso, podem ativar proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e fatores de transcrição como o NF-κB, levando a ativação de diversos genes que culminam na produção de mais citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, fatores de crescimento, dentre outros (25).

Sendo assim, as citocinas pró-inflamatórias exercem papel importante no processo de remodelamento cardíaco. Como exemplo, as citocinas TNF-α e IL-1β contribuem não somente para a disfunção ventricular e apoptose de cardiomiócitos, mas desenvolvem possuem papel fundamental no remodelamento da matriz extracelular, pois regulam a função de fibroblastos cardíacos, influenciando a síntese de colágeno e fibronectina, além de regularem também o sistema de degradação de matriz extracelular, por influenciarem a síntese de MMPs (metaloproteinases) e TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) (32, 43-48).

O TNF-α pode ser produzido por células miocárdicas, sendo assim, ele é uma das principais citocinas pró-inflamatórias estudadas em doenças cardíacas (49, 50). Existem dois receptores de TNF-α, o TNFR1 e o TNFR2, que possuem efeitos opostos em relação ao remodelamento cardíaco, hipertrofia miocárdica, ativação de NF-κB, inflamação e apoptose. Tais efeitos são desencadeados via ativação do TNFR1, enquanto o TNFR2 parece inibí-los (51).

Sendo assim, trabalhos experimentais observaram a presença de dilatação ventricular e alterações na composição do colágeno cardíaco em modelos com superexpressão de TNF-α (52). Além disso, já foi descrito que o tratamento com IL-10 recombinante (citocina anti-inflamatória) inibe a inflamação dependente da ativação do TNF-α e o estresse oxidativo, reduzindo o processo de remodelamento cardíaco e a disfunção ventricular em modelo de IC em camundongos (53).

Dados recentes demonstraram que pacientes com início de IC e IM, possuem níveis elevados de TNF-α e que isso está correlacionado com a taxa de mortalidade desses pacientes (54, 55). A superexpressão de TNF-α ou a infusão de TNF-α recombinante em ratos resulta em disfunção cardíaca com sintomas que mimetizam a IC em humanos, sendo que nestes animais, o processo de remodelamento cardíaco é influenciado pelo aumento da atividade de MMPs (56-59).

A síntese de MMPs pode ser estimulada por diversas moléculas, como IL-1β, IL-6, angiotensina II, endotelina-1 e fatores de crescimento (43, 44, 60-62). Já foi demonstrado também que o BNP e o estresse oxidativo são capazes de induzir a síntese de MMPs em quadros de remodelamento cardíaco (63, 64). Em condições normais elas são expressas em cardiomiócitos, bem como no endotélio, em células do músculo liso vascular e fibroblastos, porém em resposta ao processo inflamatório, podem também ser expressas pela infiltração de macrófagos e linfócitos (21, 65).

O aumento na atividade das MMPs está associado com diversos estados patológicos, incluindo infiltração de células tumorais, metástase, doenças fibróticas, artrites e inflamação (21). As MMP2 e MMP9 (gelatinases A e B) possuem papéis importantes em doenças cardiovasculares, como HA, aterosclerose, aneurisma, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, isquemia cardíaca, IC, hipertrofia cardíaca, dentre outras, sendo que a ativação miocárdica de ambas está associada com degradação da rede de colágeno e dilatação do ventrículo esquerdo, comprometendo desta forma a função sistólica (20, 66, 67).

Estudos recentes demonstraram que a superexpressão de MMP2 modula diretamente o remodelamento e disfunção ventricular, independente da presença de injúria adicional (68, 69). Além disso, animais knockout para MMP2 desenvolveram hipertrofia cardíaca menos severa após coarctação de aorta em relação ao grupo controle (70). Sendo assim, o aumento de MMPs, principalmente da MMP2, está relacionado com a fisiopatologia da disfunção e remodelamento cardíaco (71).

Outra molécula estudada na HA é o NF-κB, cuja ativação resulta na regulação de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Normalmente, as células após injúria iniciam um processo inflamatório, sendo este decorrente principalmente da ativação da via do NF-κB (72). Diversos estímulos podem ativar este fator de transcrição, como citocinas pró-inflamatórias, proteína kinase C e principalmente através de espécies reativas de oxigênio. Após ativação, o NF-κB migra até o núcleo celular, onde regula a transcrição de diversos genes envolvidos na patogênese de lesões inflamatórias, como IL-6, TNF-α, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, dentre outras, todas envolvidas no recrutamento de monócitos e macrófagos para o local da injúria (73).

Foi observado que a expressão do NF-κB está aumentada em pacientes e animais hipertensos, como os SHR, estando associada ao aumento da atividade de MMP2 e MMP9 nesses animais. Em modelos animais de IM, o bloqueio da ativação deste fator de transcrição foi efetivo em reduzir o processo inflamatório e o remodelamento ventricular (74). Além disso, em SHR, o bloqueio do NF-κB, reduziu também a expressão renal de ICAM-1 e MCP-1, além da atividade de MMPs e pressão arterial (75, 76). Dessa forma, o NF-κB parece desenvolver papel importante na patogênese de DCVs e vem sendo amplamente estudado nessas doenças (72).

Em conjunto, essas evidências descrevem a participação da inflamação no desenvolvimento e progressão de DCVs, como o remodelamento cardíaco. Além

disso, sabe-se que a ativação do sistema imune é um fator importante para a ativação deste processo inflamatório perante uma injúria (26, 27).

1.3 Receptores do tipo Toll

Receptores do tipo Toll (TLRs) são uma família de receptores da imunidade inata que desenvolvem papel importante na ativação de processos inflamatórios, sendo capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e também padrões moleculares associados a lesões (DAMPs) (77-79).

Atualmente foram identificados até 11 subtipos de TLRs em humanos e 13 em ratos e camundongos. Eles estão distribuídos por todo o organismo, em diversas células e tecidos, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células B, células dentríticas, células do miocárdio e endoteliais do músculo liso vascular, dentre outras (79, 80). Cada TLR possui um domínio extracelular que confere especificidade aos PAMPs, que geralmente são expostos na superfície de microorganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas. São exemplos de PAMPs o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) presente em bactérias gramnegativas, os quais são reconhecidos por TLR4, peptideoglicanos presentes em bactérias gram-positivas, que ativam TLR2, sequências de CpG de DNA e RNA de dupla fita encontrados em vírus, identificados por TLR9, dentre outros (77, 81, 82).

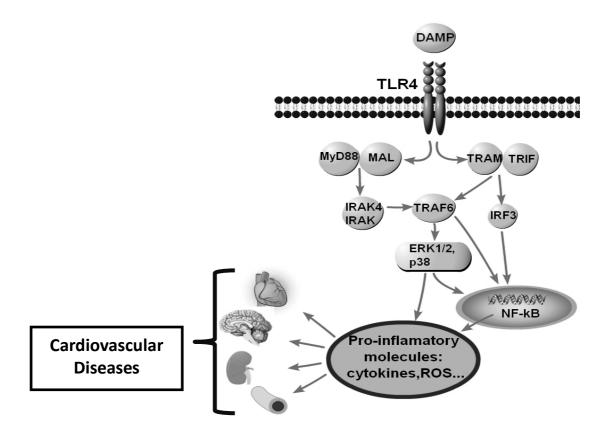
Os TLRs possuem um domínio TIR (receptor toll-interleucina-1) encontrado na região citosólica da célula e que é responsável pela ativação das vias de sinalização destes receptores (77). Conforme demonstrado na figura 1, após a ativação do TLR4, esse receptor sofre mudanças conformacionais, permitindo o recrutamento de até cinco moléculas adaptadoras, que são: MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR-associated protein) também conhecida como MAL (MyD88-adaptor-like), TRAM (Toll-receptor-associated molecule), SARM (sterile-α and heat/armadillo motif protein) e TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon). O tipo de sinalização depende do uso seletivo de diferentes combinações de moléculas adaptadoras, sendo a principal molécula adaptadora recrutada com a ativação do TLR4 a MyD88 (uma molécula compartilhada por quase todos os TLRs) (83).

Após recrutada, a MyD88 associa-se com a IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase 4), o que favorece a fosforilação da IRAK1 (interleukin-1 receptor-

associated kinase 1), permitindo a ligação da TRAF6 (TNF receptor associated fator 6) ao complexo. A ligação da TRAF6, por sua vez, ativa TAK1 (TGF-β-activated kinase 1) que faz complexo com TAB1 (TAK1 binding protein) e TAB2 (TAK2 binding protein). Após a formação desse complexo, TAK1 ativa o complexo IKK (IκB kinase) que induz a ativação de NF-κB. Simultaneamente, TAK1 ativa membros das MAPKs, induzindo assim, a produção de moléculas inflamatórias (83).

Os genes expressos em resposta a ativação do TLR4, codificam proteínas importantes como citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), moléculas de adesão endotelial, MCP-1, COX (ciclooxigenase), óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, sendo este um possível mecanismo responsável pelo aumento de moléculas inflamatórias no processo hipertensivo (80).

Figura 1 – Esquema ilustrando as principais vias de sinalização ativadas pelo TLR4 na célula.



DAMP: Damage associated molecular pathern (Padrões moleculares associados à danos); TLR: Toll like receptors (receptores do tipo Toll); MyD88: Myeloid differentiation primary response gene 88; MAL: MyD88-adaptador like; TRAM: Toll receptor associated molecule; TRIF: Toll-receptor activeted interferon; IRAK: Interleukin-1 receptor associated kinase; TRAF: TNF receptor associated fator; IRF: Interferon regulatory factor; p38 e ERK1/2: MAPKs (Proteína quinase ativada por mitógeno); NF-kB: Fator nuclear kappa-B; ROS: espécies reativas de oxigênio. Fonte: Adaptado de Bomfim et al. (72).

Os TLRs podem também ser ativados por moléculas endógenas (DAMPs), como no caso do TLR4, que pode ser ativado por HSP60, HSP70, angiotensina II, proteína amilóide A, LDL oxidado, PCR, fragmentos de hialurona, fibrinogênio, dentre outras, moléculas estas que já foram descritas como aumentadas na HA. Estes fatores podem estimular uma resposta imune inata através da ativação de TLRs mesmo na ausência de patógenos (78, 81, 84-86).

Estudos relacionando TLRs e DCVs evidenciam principalmente a participação dos TLR2 e TLR4, portanto o reconhecimento e ativação destes receptores por moléculas endógenas pode ser um elo importante entre DCVs, inflamação e ativação do sistema imune. Já foi descrito o envolvimento do TLR4 em DCVs como aterosclerose, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca, sendo que o bloqueio destes receptores parece desenvolver papel protetor no desenvolvimento destas doenças (81).

Conforme descrito anteriormente, o processo inflamatório é determinante para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, sendo assim, trabalhos recentes evidenciaram a importante participação dos TLR4 no desenvolvimento desta doença (36). Animais knockout para TLR4 e estudos epidemiológicos em humanos com polimorfismo no gene que codifica o TLR4, relatam a importância deste receptor na formação da neoíntima (85, 87). Além disso, sabe-se que estes receptores podem ser ativados por ligantes endógenos como o LDL-oxidado, principal molécula associada com o desenvolvimento destas lesões (88).

No infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca, foi observado que há aumento na expressão dos TLR4, porém os mecanismos envolvidos nestas alterações ainda permanecem desconhecidos (89). Em camundongos knockout para TLR4 e com IM induzido por coarctação de aorta, autores observaram que o TLR4 participa do remodelamento patológico do ventrículo esquerdo por induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a degradação de matriz extracelular e a hipertrofia cardíaca (90). Além disso, foi demonstrado também que na isquemia e reperfusão em camundongos knockout para TLR4, este receptor participa da resposta inflamatória neste modelo, contribuindo para a disfunção cardíaca através da produção de citocinas pró-inflamatórias (91).

Já foi descrito que a HA pode modular a expressão do TLR4, pois em animais SHR com 8 semanas de vida há aumento na expressão cardíaca deste receptor em relação aos animais controle Wistar Kyoto (92). Na clínica foi demonstrado que o polimorfismo do TLR4 Asp299Gly está associado com o desenvolvimento de menor massa ventricular esquerda em mulheres hipertensas (93). Além disso, autores descreveram que camundongos knockout para TLR4 ou machos Sprague-Dowley que receberam o bloqueio de MyD88, após coarctação de aorta, desenvolvem hipertrofia cardíaca menos severa do que animais controle, além de redução da apoptose dos cardiomiócitos (78, 94).

Em resumo, diversos dados evidenciam que os TLR4 são importantes receptores relacionados com doenças cardiovasculares, no entanto ainda há muito a ser esclarecido quanto à sua participação na fisiopatogenia do remodelamento cardíaco, uma sequela comum da hipertensão arterial.

2 OBJETIVO

Tendo em vista as evidências descritas acima, o objetivo do presente trabalho foi investigar a participação dos TLR4 no processo de remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos - SHR, por meio do antagonismo desses receptores com o anticorpo anti-TLR4.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos Wistar com 6 e 21 semanas de vida, provenientes do biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os ratos foram mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno (cinco animais por caixa) em ambiente com temperatura controlada (24 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro (12 horas/12 horas), com livre acesso à água e alimento.

Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão Experimental no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP na data de 06/12/2010 sob o número 145, folha 95, livro 2.

3.2 Tratamento com anticorpo anti-TLR4

Ratos SHR e Wistar com 19 semanas de vida foram submetidos ao tratamento com anticorpo anti-TLR4 (SC-13591, monoclonal IgG2a, Santa Cruz, EUA) diluído em salina, na dose de 1µg por dia, durante 15 dias via intraperitoneal. Os animais controles foram tratados com anticorpo IgG2a inespecífico (SC-2026, Santa Cruz, EUA) com o intuito de descartar efeitos inespecíficos do anticorpo anti-TLR4. A dose do anticorpo anti-TLR4 foi escolhida baseada em artigo publicado por Milanski et al. (95). Após tratamento, estes animais estavam com 21 semanas de vida e foram então utilizados para as análises experimentais.

3.3 Grupos experimentais

Ao total foram utilizados 6 grupos experimentais neste trabalho, que foram divididos e nomeados da seguinte forma: SHR 6 sem. (ratos SHR com 6 semanas de idade); Wistar 6 sem. (ratos Wistar com 6 semanas de idade); SHR 21 sem. (ratos SHR com 21 semanas de idade); Wistar 21 sem. (ratos Wistar com 21 semanas de idade); SHR IgG (ratos SHR com 21 semanas de idade e tratados com

anticorpo IgG2a inespecífico); Wistar IgG (ratos Wistar com 21 semanas de idade e tratados com anticorpo IgG2a inespecífico); SHR Anti-TLR4 (ratos SHR com 21 semanas de idade e tratados com anticorpo anti-TLR4); Wistar Anti-TLR4 (ratos Wistar com 21 semanas de idade e tratados com anticorpo anti-TLR4).

3.4 Níveis de RNAm pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

Foram avaliados os níveis do RNAm de genes no ventrículo esquerdo de todos os grupos experimentais. Para tal, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, intraperitoneal), posteriormente os corações foram removidos, os ventrículos esquerdos isolados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até a data de processamento.

O RNA total (tRNA) foi obtido utilizando o método de Trizol (LifeTechnologies Inc., EUA), seguindo as orientações do fabricante. Após a obtenção do tRNA, a integridade das amostras foi verificada pela presença da banda 18s em gel de poliacrilamida. As amostras foram então submetidas à digestão com DNase. Após esse procedimento, 2 µg do tRNA de cada amostra foi utilizado para obtenção de DNA complementar (cDNA) pelo método da trascriptase reversa (reação de RT) utilizando-se a enzima MMLV. A reação de RT-PCR foi realizada em um volume final de 14 µL contendo oligonucleotídeos específicos, que foram construídos a partir de informações retiradas do GENEBANK. A amplificação do cDNA foi avaliada utilizando o reagente SYBR® green (Invitrogen) e o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Australia).

Para amplificação do RNAm, as amostras foram mantidas 2 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos na seguinte condição: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 20 segundos. A especificidade da reação com SYBR® green foi confirmada pela análise da curva de dissociação utilizando como base a temperatura de dissociação (melting point). A expressão do RNAm foi quantificada utilizando o cálculo do DDCt (96). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e normalizadas pela expressão de β-actina.

Foram avaliados os níveis do RNAm do TLR4 nos grupos SHR 6sem., Wistar 6sem., SHR 21sem., Wistar 12 sem., SHR IgG e SHR Anti-TLR4. Já os níveis do RNAm da molécula adaptadora MyD88, dos colágenos tipo I e tipo III, das

metaloproteinases tipo 2 e tipo 9, dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP, BNP e α-actina esquelética, foram avaliados somente nos grupos SHR IgG e SHR Anti-TLR4. Os níveis do RNAm estão representados como porcentagem do grupo controle e expressos em unidades arbitrárias (UA).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos do TLR4, do MyD88, dos colágenos I e III, das metaloproteinases 2 e 9, dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP, BNP e alfa actina esquelética e do padrão normalizador β-actina.

	Genes	Sense	Anti-sense
TLR4	TLR4	tcacaacttcagtggctgga	tcctggggaaaaactcttga
MyD88	MYD88	atgaactgaaggaccgcatc	ttgtctgtgggacactgctc
Colágeno I	COL1A1	cgagacccttctcactcctg	gcatccttggttagggtcaa
Colágeno III	COL3A1	gggatccaatgagggagaat	ggccttgcgtgtttgatatt
MMP2	MMP2	tggtgtggcaccaccgagga	accttgccatcgcttcggcc
MMP9	MMP9	caatccttgcaatgtggatg	ttcctccgtgattcgagaac
ANP	NPPA	agtgcggtgtccaacacag	cttcatcggtctgctcgct
BNP	NPPB	cagaacaatccacgatgcag	gctgtctctgagccatttcc
α-actina	ACTA1	cctgccacacgccatcat	gctcggtgaggattttcatcag
esquelética			
β-actina	ACTB	aagatttggcaccacactttctaca	cggtgagcagcacagggt

TLR4: receptor do tipo Toll 4; MyD88: molécula adaptadora "myeloid differentiation primary response gene (88); MMP2: metaloproteinase 2; MMP9: metaloproteinase 9; ANP: peptídeo natriurético atrial; BNP: peptídeo natriurético cerebral.

3.5 Análises histológicas em ventrículo esquerdo

Foi avaliada a deposição de colágeno total através da técnica de coloração com picro-sirius, e o diâmetro e a área total dos cardiomiócitos através da técnica de coloração com hematoxilina-eosina, no ventrículo esquerdo dos grupos experimentais SHR IgG, Wistar IgG, SHR Anti-TLR4 e Wistar Anti-TLR4.

Para tal, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, intraperitoneal), os corações removidos, lavados em solução de krebs aerado e mergulhados em solução de cloreto de cádmio 100 mM por cerca de 3 minutos, para indução de parada cardíaca em diástole. Após parada cardíaca, o ápice e a base dos corações foram removidos e a região central remanescente, contendo tanto o ventrículo direito como o esquerdo, foi imersa em solução fixadora de formalina 4% por 24 horas e mantida em geladeira.

Posteriormente a fixação, os corações foram então desidratados através de 2 banhos de 1 hora cada em álcool 92%, 4 banhos 1 hora cada em álcool absoluto, 3 banhos de 1 hora cada em xilol e posteriormente 3 banhos de 1 hora cada em parafina. Após a desidratação os corações foram emblocados em parafina, através de um autoinclusor (aparelho que mantém a parafina aquecida e que contém uma placa de gelo para resfriamento rápido da mesma).

Os blocos foram cortados em micrótomo de parafina, com uma espessura média de 3-4 micrômetros (µm), estendidos em lâminas de vidro e mantidos por cerca de 24 horas em estufa para secar. Anteriormente a cada coloração, os cortes foram desparafinados e hidratados, através de banho em xilol aquecido em estufa a 60 °C por 20 segundos, banho em xilol à temperatura ambiente por 20 segundos, banho em álcool absoluto por 20 segundos, banho em álcool 95% por 20 segundos, banho em álcool 70% por 20 segundos e posteriormente lavagem em água corrente por 30 segundos.

Após desparafinadas e hidratadas, as lâminas foram então coradas com hematoxilina e eosina ou picro-sirius, sendo o ensaio conduzido conforme descrito pelos fabricantes dos kits. Todas as análises histológicas foram realizadas utilizando um microscópio óptico acoplado a um programa de computador específico para análise de imagens (KS-300, ZEISS) e analisadas utilizando-se o programa Image-Pro Plus 6.3 (Media Cybernetics Inc., EUA). Para as análises de deposição de colágeno total, foi avaliada a densidade de vermelho e os valores estão representados como coloração/área. Para as análises de área total e diâmetro de cardiomiócitos, as membranas plasmáticas foram selecionadas e o diâmetro transverso foi medido, foram analisados cerca de 70 miócitos por animal e os valores estão representados como μm² ου μm, respectivamente.

3.6 Medidas hemodinâmicas (pressão arterial direta e frequência cardíaca)

Para avaliação dos parâmetros hemodinâmicos foi utilizado o método de canulação da artéria carótida. Após tratamento de 15 dias, os ratos pertencentes aos grupos SHR IgG, Wistar IgG, SHR Anti-TLR4 e Wistar Anti-TLR4 foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina (90 e 5 mg/kg respectivamente, via intraperitonial) e submetidos à canulação da artéria carótida direita. Para tal, foi utilizado um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina heparinizada (100 U/mL). Após 24 horas e com os ratos acordados, este cateter foi conectado a um transdutor de pressão (Deltran DPT-100, Utah medical products, Midvale, EUA) ligado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália), que por sua vez está acoplado a um sistema digital de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália) para aquisição dos registros de pressão arterial. Cada animal foi registrado por cerca de 1 a 2 horas e a frequência cardíaca foi calculada a partir dos registros obtidos com a pressão arterial. Os valores de pressão arterial média estão representados como mmHq e os de frequência cardíaca como batimentos/minuto.

3.7 Expressão protéica pela técnica de Western Blotting

Foi avaliada a expressão de proteínas no ventrículo esquerdo dos grupos experimentais SHR IgG e SHR Anti-TLR4. Para tal, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, intraperitoneal), os corações removidos, os ventrículos esquerdos isolados e congelados imediatamente em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até a data do processamento.

As amostras foram pulverizadas em almofariz de porcelana e pistilo, homogeneizadas e incubadas por 30 minutos em 400 µL de tampão de lise gelado (Triton-X-100 1%, Tris 100mM pH 7.4, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml). Os extratos teciduais foram centrifugados a 12000 RPM a 4 °C por 30 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e utilizado para quantificação do conteúdo protéico total, utilizando o método de BCA (ácido bicincônínico, Thermo Scientific). Posteriormente, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotreitol, 200

mM). Foram utilizados 75 µg de proteína de cada amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 10% ou 12%) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, EUA) a 100 V. Em cada gel foi aplicado também um marcador com peso molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de aparelho da BioRad por 1 hora a 100 V em tampão de transferência contendo SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular.

As membranas de nitrocelulose foram então incubadas com solução bloqueadora (albumina bovina 5% ou leite desnatado 5%) em temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos na membrana.

As membranas foram então incubadas individualmente com os diferentes anticorpos primários anti-TLR4 (1:200, SC-16240, SantaCruz), anti-MyD88 (1:200, SC-11356, SantaCruz), anti-TNF-α (1:1000, 506101, Biolegend), anti-IL1β (1:750, 503501, BioLegend), anti-IL-6 (1:1000, ab6672, Abcam) ou anti-GAPDH (1:1000, SC-32233, SantaCruz) na presença de solução bloqueadora (albumina bovina 5% ou leite desnatado 5%), por 16 horas a 4 °C. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com solução tampão (TBS-T) em temperatura ambiente e posteriormente incubadas com os anticorpos secundários anti-Rabbit (1:2000, 111-035-144, Jackson ImmunoResearch), anti-Goat (1:5000, 705-166-147, Jackson ImmunoResearch), anti-Hamster (1:2000, 1:3000, 127-035-099, Jackson ImmunoResearch) ou anti-Mouse (1:5000, 115-005-166, Jackson ImmunoResearch) também na presença de solução bloqueadora (albumina bovina 5% ou leite desnatado 5%). O procedimento de lavagem foi repetido novamente e posteriormente as membranas foram incubadas com solução quimioluminescente por 5 minutos, como descrito no kit (Signal West Pico Chemiluminescent, Thermo Scientific). A quimioluminescência foi detectada e visualizada em auto-radiografias. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização do programa de análise de intensidade de bandas ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). A normalização das amostras foi realizada utilizando GAPDH e os valores estão representados como porcentagem do grupo controle.

3.8 Análise estatística

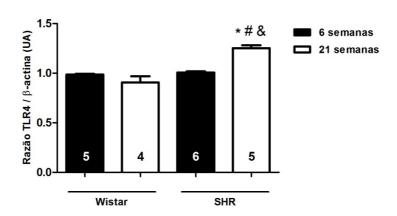
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm). As análises foram realizadas no Programa Prisma versão 7, utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido de teste de comparações, Bonferroni ou o teste "t" de Student não pareado, quando pertinente. O nível de significância adotado foi de p<0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Níveis de RNAm do TLR4 em ventrículo esquerdo de ratos SHR e Wistar com 6 e 21 semanas de idade

Os níveis de RNAm do TLR4 no ventrículo esquerdo dos SHR com 21 semanas de idade $(1,25\pm0,03)$ foram maiores em relação à dos SHR com 6 semanas de idade $(1,00\pm0,01)$, bem como em relação à dos seus respectivos controles normotensos Wistar com 6 $(0,99\pm0,01)$ e 21 semanas de idade $(0,91\pm0,06)$ (Figura 2).

Figura 2 – Níveis de RNAm do TLR4 em ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 6 e 21 semanas de idade.



O gráfico em histograma de barras mostra os níveis de RNAm (UA) do TLR4 em ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 6 e 21 semanas de idade. Os valores foram normalizados pela β -actina. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. *p<0,05 vs. Wistar 6sem.; #p<0,05 vs. Wistar 21sem; &p<0,05 vs. SHR 6sem.

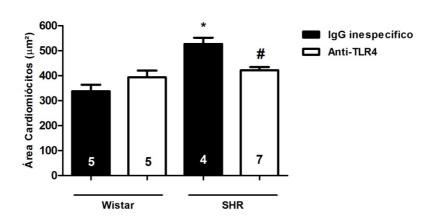
4.2 Área e diâmetro de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

Observamos que animais SHR IgG apresentam maior área (SHR IgG 526,80±24,99 / Wistar IgG 337,60±25,91) (Figura 3A) e diâmetro dos cardiomiócitos

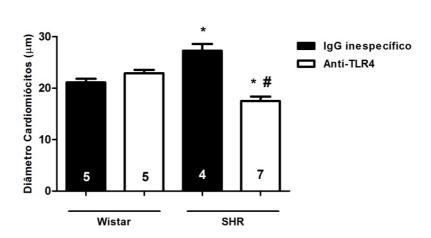
(SHR IgG 27,30±1,28 / Wistar IgG 21,12±0,69) (Figura 3B) em relação aos Wistar IgG. Além disso, observamos também que o tratamento de SHR com anti-TLR4 reduziu tanto a área (SHR: IgG - 526,80±24,99 / Anti-TLR4 - 422,00±12,42) (Figura 3A), quanto o diâmetro dos cardiomiócitos (SHR: IgG - 27,30±1,28 / Anti-TLR4 - 17,50±0,87) (Figura 3B) destes animais em relação aos SHR IgG. Entretanto, não houve nenhuma alteração na área (Wistar: IgG - 337,60±25,91 / Anti-TLR4 - 393,70±26,77) e no diâmetro dos cardiomiócitos (Wistar: IgG - 21,12±0,69 / Anti-TLR4 - 22,90±0,66) entre os grupos Wistar Anti-TLR4 e Wistar IgG.

Figura 3 – Área (A), diâmetro (B) e figuras ilustrativas (C) de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.

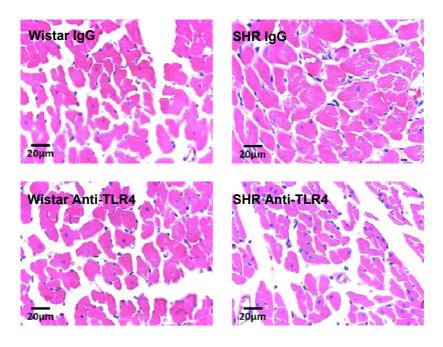
Α



В



C



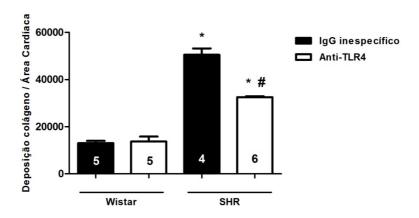
Os gráficos em histograma de barras mostram em (A) a área (μ m²) e em (B) o diâmetro (μ m) de cardiomiócitos de ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. *p<0,05 vs. Wistar IgG; #p<0,05 vs. SHR IgG. Em (C), imagens representativas dos cardiomiócitos em cortes de ventrículo esquerdo (3-4 μ m), no aumento de 20x.

4.3 Deposição de colágeno em ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

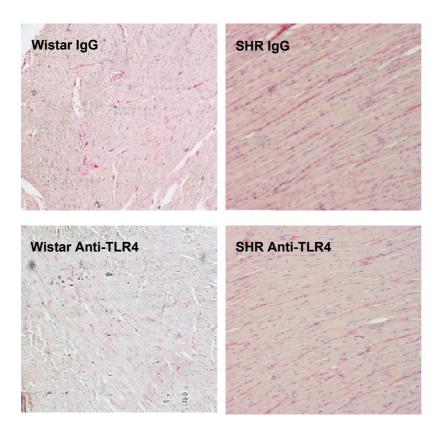
Observamos que animais SHR IgG apresentam maior deposição de colágeno (SHR IgG 50457±2727 / Wistar IgG 13036±1005) (Figura 4A) em ventrículo esquerdo em relação aos Wistar IgG. Além disso, observamos também que o tratamento de SHR com o anticorpo anti-TLR4 reduziu a deposição de colágeno (SHR: IgG - 50457±2727 / Anti-TLR4 - 32525±392) no ventrículo esquerdo destes animais em relação aos SHR IgG. Apesar disso, não foi observada nenhuma alteração entre os grupos Wistar Anti-TLR4 e Wistar IgG (Wistar: IgG - 13036±1005 / Anti-TLR4 - 13744±2066) (Figura 4A).

Figura 4 – Deposição de colágeno (A) e figuras ilustrativas (B) de ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.

Α



В



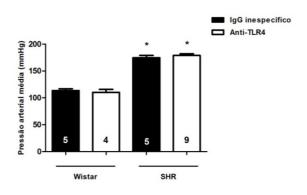
O gráfico em histograma de barras mostra em (A) a deposição de colágeno (UA) em ventrículo esquerdo de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. Os valores foram representados como coloração/área. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média ± erro padrão da media. *p<0,05 vs. Wistar IgG; #p<0,05 vs. SHR IgG. Em (B), imagens representativas da deposição de colágeno em cortes (3-4 µm) de ventrículo esquerdo, no aumento de 10x.

4.4 Níveis Pressóricos (pressão arterial média e frequência cardíaca) de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

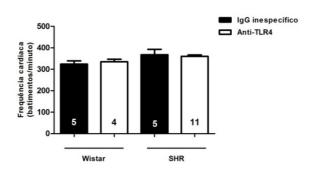
Observamos que animais SHR apresentam maiores níveis de pressão arterial (SHR IgG 174,83±4,20 / SHR Anti-TLR4 178,96±3,26 / Wistar IgG 113,52±3,21) (Figura 5A) em relação aos Wistar IgG. Além disso, observamos que o tratamento com anticorpo anti-TLR4 não alterou os valores de pressão arterial média (SHR: IgG - 174,83±4,20 / Anti-TLR4 - 178,96±3,26) (Wistar: IgG - 113,52±3,21 / Anti-TLR4 - 110,22±5,59) (Figura 5A) e de frequência cardíaca (SHR: IgG - 367,65±25,41 / Anti-TLR4 - 360,64±6,60) (Wistar: IgG - 324,06±15,23 / Anti-TLR4 - 335,37±11,68) (Figura 5B) dos animais Anti-TLR4 em relação aos animais IgG.

Figura 5 – Pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.

Α



В



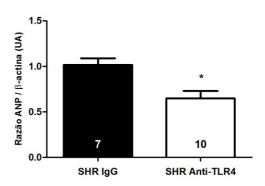
Os gráficos em histograma de barras mostram em (A) a pressão arterial média (mmHg) e em (B) a frequência cardíaca (batimentos/minuto) de SHR e Wistar com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média ± erro padrão da media. *p<0,05 vs. Wistar IgG.

4.5 Níveis de RNAm dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP, BNP e alfa actina esquelética em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

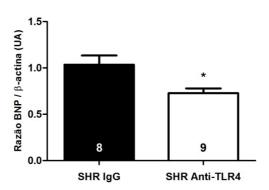
Animais SHR tratados com anti-TLR4, apresentaram redução nos níveis de RNAm dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP (SHR: $IgG - 1,02\pm0,07$ / Anti-TLR4 - 0,65±0,08) (Figura 6A), BNP (SHR: $IgG - 1,04\pm0,09$ / Anti-TLR4 - 0,73±0,05) (Figura 6B) e α -actina esquelética (SHR: $IgG - 1,02\pm0,08$ / Anti-TLR4 - 0,69±0,04) (Figura 6C) em relação aos SHR IgG.

Figura 6 – Níveis de RNAm dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP (A), BNP (B) e α-actina esquelética (C) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.

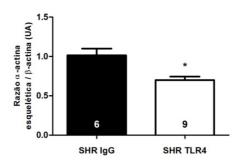
Α



В



C

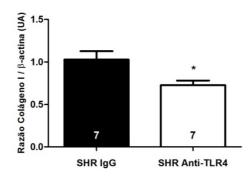


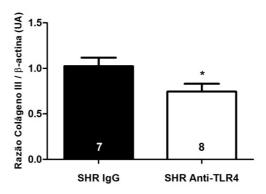
Os gráficos em histograma de barras mostram os dos níveis de RNAm (UA) dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP (A), BNP (B) e alfa actina esquelética (C) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após o tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. Os valores foram corrigidos pela β -actina. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. \pm 0,05 vs. SHR IgG.

4.6 Níveis de RNAm dos colágenos tipo I e tipo III em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

O tratamento de SHR com o anticorpo anti-TLR4 reduziu tanto os níveis do RNAm do colágeno tipo I (SHR: IgG - 1,03±0,09 / Anti-TLR4 - 0,73±0,05) (Figura 7A), bem como do colágeno tipo III (SHR: IgG - 1,02±0,09 / Anti-TLR4 - 0,74±0,08) (Figura 7B) em relação aos animais SHR IgG

Figura 7 – Níveis de RNAm dos colágenos tipo I (A) e tipo III (B) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.



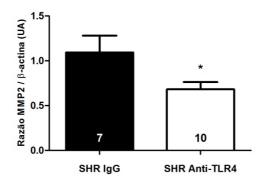


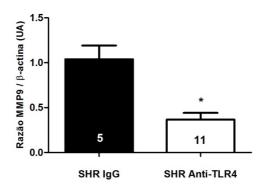
Os gráficos em histograma de barras mostram os níveis de RNAm (UA) dos colágenos tipo I (A) e tipo III (B) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após o tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. Os valores foram normalizados pela β -actina. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. *p<0,05 vs. SHR IgG.

4.7 Níveis de RNAm das metaloproteinases tipo 2 e tipo 9 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

O tratamento de SHR com anti-TLR4 reduziu tanto os níveis de RNAm da metaloproteinase tipo 2 (SHR: IgG - 1,09±0,19 / Anti-TLR4 - 0,68±0,08) (Figura 8A), quanto da metaloproteinase tipo 9 (SHR: IgG - 1,04±0,15 / Anti-TLR4 - 0,37±0,07) (Figura 8B) em relação aos SHR IgG.

Figura 8 – Níveis de RNAm das metaloproteinases tipo 2 (A) e tipo 9 (B) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.



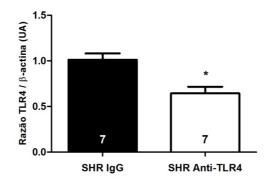


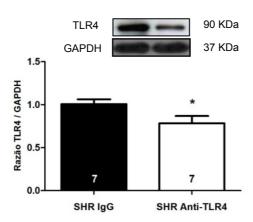
Os gráficos em histograma de barras mostram os níveis de RNAm (UA) das metaloproteinases tipo 2 (A) e tipo 9 (B) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após o tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. Os valores foram corrigidos pela β -actina. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. *p<0,05 ν s. SHR IgG.

4.8 Níveis de RNAm e expressão protéica do TLR4 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

O tratamento de SHR com anticorpo anti-TLR4 reduziu tanto os níveis de RNAm (SHR: IgG - 1,01±0,07 / Anti-TLR4 - 0,64±0,07) (Figura 9A), bem como a expressão protéica (SHR: IgG - 1,01±0,05 / Anti-TLR4 - 0,78±0,08) (Figura 9B) do TLR4 em relação aos animais SHR IgG.

Figura 9 – Níveis de RNAm (A) e expressão protéica (B) do TLR4 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.



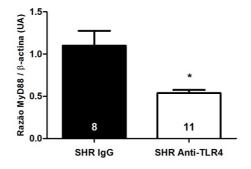


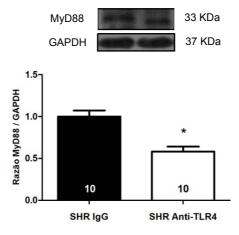
Os gráficos em histograma de barras mostram em (A) os níveis de RNAm (UA) e em (B) da expressão protéica (UA) do TLR4 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. Os valores foram normalizados pela β -actina (A) ou GAPDH (B). O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. *p<0,05 ν s. SHR IgG.

4.9 Níveis de RNAm e expressão protéica da molécula adaptadora MyD88 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

O tratamento de SHR com anticorpo anti-TLR4 reduziu tanto os níveis de RNAm (SHR: IgG - 1,10±0,17 / Anti-TLR4 - 0,54±0,03) (Figura 10A), bem como a expressão protéica (SHR: IgG – 1,00±0,07 / Anti-TLR4 - 0,58±0,06) (Figura 10B) da molécula adaptadora MyD88 em relação aos animais SHR IgG.

Figura 10 – Níveis de RNAm (A) e expressão protéica (B) da molécula adaptadora MyD88 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.



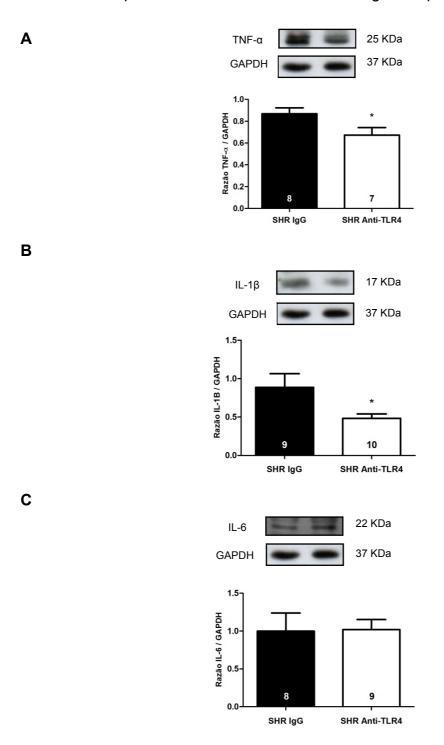


Os gráficos em histograma de barras mostram em (A) os níveis de RNAm (UA) e em (B) da expressão protéica (UA) da molécula adaptadora MyD88 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. Os valores foram normalizados pela β -actina (A) ou GAPDH (B). O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. *p<0,05 ν s. SHR IgG.

4.10 Expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β e IL-6 em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico

O tratamento de SHR com o anticorpo anti-TLR4 reduziu a expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (SHR: IgG - 0,87±0,05 / SHR Anti-TLR4 - 0,67±0,07) (Figura 11A) e IL-1 β (SHR: IgG - 0,87±0,18 / Anti-TLR4 - 0,48±0,06) (Figura 11B) em relação aos SHR IgG. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica da citocina pró-inflamatória IL-6 (SHR: IgG - 0,99±0,24 Anti-TLR4 - 1,02±0,13) (Figura 11 C).

Figura 11 – Expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNF-α (A), IL-1β (B) e IL-6 (C) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anti-TLR4 ou IgG inespecífico.



Os gráficos em histograma de barras mostram a expressão protéica (UA) das citocinas próinflamatórias TNF- α (A), IL-1 β (B) e IL-6 (C) em ventrículo esquerdo de SHR com 21 semanas de idade após tratamento com anticorpo anti-TLR4 ou IgG inespecífico. Os valores foram normalizados pelo GAPDH. O número de animais por grupo encontra-se dentro das barras e os valores foram expressos como média \pm erro padrão da media. *p<0,05 ν s. SHR IgG.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi o primeiro a demonstrar a participação do TLR4 no processo de remodelamento cardíaco de ratos espontaneamente hipertensos - SHR adultos, visto que este processo foi reduzido após tratamento destes animais com anticorpo anti-TLR4. É provável que esta redução esteja relacionada à menor expressão protéica das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β, uma vez que o referido tratamento não alterou os valores pressóricos destes animais.

Tendo em vista a estreita relação entre TLR4 e DCVs, avaliamos neste trabalho se o desenvolvimento temporal da HA e consequentemente do remodelamento cardíaco em SHR, estão associados à alteração nos níveis desse receptor no ventrículo esquerdo desses animais. De fato observamos aumento nos níveis de TLR4 no ventrículo esquerdo de SHR adultos, possivelmente devido ao aumento da pressão arterial e não da idade desses animais, uma vez que isso não foi constatado em ratos normotensos Wistar de mesma idade. Resultados semelhantes foram demonstrados em SHR/WKY e em outros modelos de HA em ratos e camundongos (92, 97). É importante ressaltar ainda, que aumento da expressão dos TLR4 em arteríolas mesentéricas de resistência de SHR adultos também foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa (98). Sendo assim, analisando nossos resultados juntamente com os de outros autores, podemos sugerir que o aumento da PA modula a expressão dos TLR4 não somente no coração, mas também no tecido vascular desses animais.

Em virtude do demonstrado acima, isto é, que os níveis de TLR4 estão associados ao aumento da pressão arterial em SHR adultos, aventamos a hipótese que o mesmo possa influenciar o processo de remodelamento cardíaco decorrente da HA observada nesses animais. Para confirmar esta hipótese, antagonizamos a ativação dos TLR4 administrando, por quinze dias via intraperitoneal, o anticorpo anti-TLR4 em SHR e Wistar adultos. Verificamos apenas em SHR diminuição da área e do diâmetro dos cardiomiócitos, bem como da deposição de colágeno em ventrículo esquerdo desses animais. É importante ressaltar que as alterações nesses parâmetros relacionados ao remodelamento cardíaco, parecem ser devidas a ação específica do tratamento com anti-TLR4, uma vez que o tratamento dos animais com anticorpo IgG inespecífico, eliminou a possibilidade de ação inespecífica do anti-TLR4, confirmando assim, de maneira inédita a nossa hipótese.

Sabe-se que a HA é fator determinante para o desenvolvimento de remodelamento cardíaco e que tratamentos com anti-hipertensivos diminuem o estresse da parede ventricular, sendo assim, foi demonstrado que inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs), antagonistas de canais de cálcio e alguns betabloqueadores, foram eficazes em reduzir a massa cardíaca hipertrofiada e a deposição de colágeno cardíaco (12, 13, 99-101). Portanto diminuição de níveis pressóricos per se é um dos mecanismos envolvidos com a redução do processo de remodelamento cardíaco.

Nesse trabalho demonstramos que o tratamento com anti-TLR4 reduziu o remodelamento cardíaco de SHR adultos. Observamos que esse fenômeno foi independente de alterações pressóricas, uma vez que o referido tratamento não alterou os valores de pressão arterial média e a frequência cardíaca desses animais. Portanto esses resultados nos permitem concluir que a redução do remodelamento ventricular esquerdo de SHR adultos observada em nosso trabalho, está diretamente associada ao antagonismo dos TLR4. É importante ressaltar que nenhuma das alterações relacionadas ao remodelamento cardíaco de SHR foram observadas em ratos normotensos Wistar, sendo assim, os parâmetros envolvidos com este fenômeno somente foram avaliados em animais SHR.

Sabe-se que na hipertrofia cardíaca há a re-expressão de genes que estão expressos no período fetal participando da homeostase cardíaca, tais como ANP, BNP e α-actina esquelética, dentre outros e que estão quiescentes no coração adulto. Estudos demonstraram que esses genes estimulam não só a hipertrofia como também a síntese e degradação de matriz extracelular cardíaca. Acredita-se, que a re-expressão desses genes seja uma resposta do organismo para tentar reestabelecer a homeostase cardíaca, devido aos seus efeitos inotrópicos positivos, vasodilatadores e natriuréticos (11, 13, 63).

Já está bem estabelecido que a hipertrofia cardíaca é uma das características que define o processo de remodelamento cardíaco observado na hipertensão arterial. Em nosso trabalho, a redução da hipertrofia cardíaca após tratamento de SHR adultos com anti-TLR4, foi constatada através da diminuição do diâmetro e da área dos cardiomiócitos. Esse último resultado está de acordo com os demonstrados em camundongos knockout para TLR4 e ratos Sprague-Dawley com bloqueio de MyD88, tornados hipertensos por coarctação de aorta (78, 94). Demonstramos também que o tratamento anti-TLR4 reduziu os níveis dos marcadores de hipertrofia

cardíaca ANP, BNP e α-actina esquelética em SHR adultos. Os resultados por nós obtidos com ANP e BNP não foram observados em camundongos knockout para TLR4 e camundongos tratados com Eritoran, um inibidor do TLR4 (78, 97). É provável que esses resultados discrepantes sejam devidos a diferenças na espécie animal e/ou grau de especificidade dos antagonistas do TLR4 utilizados. Sendo assim, a redução cardíaca nos níveis desses genes encontrado em nosso trabalho indica um possível retorno a homeostase cardíaca e juntamente com a redução da área e diâmetro dos cardiomiócitos, nos permite sugerir que os TLR4 participam diretamente do processo hipertrófico miocárdico presentes em animais SHR adultos.

Atualmente trabalhos descrevem que tratamentos que modulam o colágeno da matriz extracelular cardíaca visam restaurar o equilíbrio entre síntese e degradação, com o objetivo de preservar o colágeno da matriz e impedir o acúmulo patológico do mesmo (28, 66, 68, 69). Foi demonstrado nesse trabalho que o tratamento de SHR adultos com anti-TLR4 reduziu a fibrose cardíaca, fato este constatado tanto pela redução dos níveis dos colágenos tipo I e III, quanto pela deposição de colágeno nos corações destes animais. Esse último resultado está de acordo com os observados em camundongos knockout para TLR4 e ratos Sprague-Dawley com bloqueio de MyD88, tornados hipertensos por coarctação de aorta (78, 94). Além disso, observamos também que o tratamento reduziu os níveis das MMP2 e MMP9, enzimas estas que estão intimamente envolvidas com o remodelamento cardíaco e comprometimento da função sistólica. Resultados semelhantes foram encontrados também em camundongos tornados hipertensos por coarctação de aorta e tratados com Eritoran, um inibidor do TLR4 (97).

Como já descrito anteriormente, as MMPs são enzimas importantes para o processo de remodelamento cardíaco, portanto, diversos trabalhos buscam compreender o papel delas na homeostase cardíaca. Já foi demonstrado, por exemplo, que infusão de MMP2 em modelo de isquemia e reperfusão contribui para a disfunção cardíaca em ratos Sprague-Dowley (102). Além disso, camundongos com superexpressão cardíaca de MMP2 desenvolveram disfunção sistólica, fibrose e apoptose de cardiomiócitos, portanto, o aumento de MMPs é considerado um determinante direto para o remodelamento cardíaco e disfunção ventricular sem a presença de injúria adicional e tratamentos que reduzam seus níveis ou atividade parecem promissores (68, 69). Dessa forma, foi demonstrado que a inibição destas enzimas após IM, através da administração de doxaciclina e enalapril (IECA) em

doses subpressoras, reduz o remodelamento cardíaco e preserva a estrutura ventricular, estudos estes realizados em diversos modelos experimentais (103-109).

Sabendo então que na HA e no remodelamento cardíaco há aumento de MMPs e que a redução de seus níveis ou atividade é benéfica nestas condições, sugerimos que a redução da fibrose cardíaca observada em nosso trabalho pode ser decorrente tanto da redução da deposição de colágeno cardíaco, bem como com da restauração do equilíbrio entre síntese e degradação do colágeno miocárdico observado através da redução dos níveis de MMPs, sugerindo desta forma, que os TLR4 além de participarem diretamente da hipertrófica cardíaca em SHR adultos, participam também diretamente do processo de fibrose cardíaca desses animais.

Após a constatação da participação do TLR4 no processo de remodelamento cardíaco de SHR adultos, a próxima etapa do nosso trabalho foi investigar as possíveis vias de sinalização responsáveis por este efeito. Verificamos que o tratamento de SHR com anti-TLR4 reduziu a expressão cardíaca do próprio TLR4 o que interfere no seu processo de sinalização celular, visto que esses animais apresentaram também redução da expressão da molécula adaptadora MyD88, bem como das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β, alguns produtos desta sinalização. Uma das hipóteses para explicar esse fenômeno é que esse receptor seja autorregulável, uma vez que há trabalhos demonstrando que após ativação do TLR4 com LPS há aumento de sua própria expressão (89, 110).

O estresse da parede ventricular gerado pela HA pode ativar processo inflamatório local, afetando tanto o desenvolvimento, como a progressão do processo de remodelamento cardíaco (29). De fato, observamos que o tratamento de SHR adultos com anticorpo anti-TLR4 reduziu a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β, que estão envolvidas na HA e em diversas doenças cardiovasculares. Sendo assim, tem sido demonstrado que tratamentos anti-inflamatórios, como com inibidores dos receptores de IL-1 e de COX2, reduzem a apoptose dos cardiomiócitos e o remodelamento ventricular esquerdo de camundongos e de ratos após infarto agudo do miocárdio, exercendo portanto efeitos benéficos no remodelamento e disfunção ventricular (111-113).

O aumento nos níveis de TNF-α e IL-1β está associado à fibrose, hipertrofia e apoptose cardíaca, bem como a síntese de outras moléculas pró-inflamatórias, MMPs e BNP, devido a capacidade dessas citocinas ativarem fatores como MAPKs, NF-κB e caspase 3, dentre outros, moléculas estas envolvidas na diferenciação,

proliferação e apoptose celular (56-59, 114, 115). Além disso, é importante destacar que modelos experimentais com superexpressão de TNF-α ou que receberam infusão de altas doses desta citocina, apresentam aumento na deposição de colágeno cardíaco, bem como hipertrofia ventricular esquerda (57, 116, 117). Portanto, sugerimos que a redução do processo de remodelamento cardíaco de SHR adultos encontrada em nosso trabalho após o tratamento com anticorpo anti-TLR4, possa ser decorrente da menor ativação da via de sinalização desses receptores, resultando em redução da expressão destas citocinas pró-inflamatórias que exercem influência direta sobre o processo de remodelamento cardíaco.

Resumindo, nesse trabalho demonstramos que:

- Os TLR4 estão aumentados no ventrículo esquerdo de SHR adultos.
- O tratamento com anticorpo anti-TLR4 reduziu o remodelamento ventricular esquerdo de SHR adultos:
 - a) sem alterar os níveis pressóricos desses animais (pressão arterial média e frequência cardíaca).
 - b) por diminuir a hipertrofia dos cardiomiócitos (área e diâmetro) e os níveis dos marcadores ANP, BNP e α -actina esquelética.
 - c) por diminuir a fibrose miocárdica (deposição de colágeno) e os níveis dos colágenos tipo I e III e das metaloproteinases tipo 2 e 9.
 - d) por diminuir a expressão protéica dos TLR4, da MyD88 e das citocinas próinflamatórias TNF-α e IL-1β.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que os TLR4 participam diretamente do processo de remodelamento ventricular esquerdo de ratos espontaneamente hipertensos – SHR adultos.

REFERÊNCIAS*

- 1. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 17, p. 1-51, 2010.
- 2. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia:** bases patológicas das doenças. 7. edição. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2005. 1592 p.
- 3. KEARNEY, P. M.; WHELTON, M.; REYNOLDS, K.; MUNTNER, P.; WHELTON, P. K.; HE, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet**, v. 365, p. 217-223, 2005.
- 4. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **DATASUS**. Disponivel em: http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php?area=0203>. Acesso em: 24 jan. 2009.
- 5. GOODMAN, L.; AUSIELLO, D. **Tratado de medicina interna**. 22. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2005. 1280 p.
- 6. FAZAN, R.; SILVA, V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 19-29, 2001.
- 7. MILL, J. G.; VASSALLO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 63-75, 2001.
- 8. WRIGHT, J. W.; MIZUTANI, S.; HARDING, J. W. Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. **Heart Failure Reviews**, n. 13, p. 367-375, 2007.
- 9. NOGUEIRA, J. B. Left ventricular hypertrophy in systemic hypertension benefits of its reversal. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 73, p. 108-112, 1999.
- 10. LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection and prognosis. **Circulation**, v. 102, p. 470-479, 2000.
- 11. MATSUBARA, B. B.; FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Aspectos anatomopatológicos da disfunção ventricular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 3, p. 361-370, 2002.
- 12. FRANCHINI, K. G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, p. 125-142, 2001.
- 13. SAFI Jr., J. Hipertrofia miocárdica e biologia molecular. HiperAtivo, v. 3, p. 154-160, 1998.
- 14. SILVA, G. J. J.; KRIEGER, J. E. Hipertrofia ventricular esquerda na hipertensão arterial. **Hipertensão**, v. 3, p. 156-160, 2000.
- 15. SHIH-HUNG, T.; YEN-YUE, L.; SHI-JYE, C.; CHING-WANG, H.; SHU-MENG, C. Interpretation and use of natriuretic peptides in non-congestive heart failure settings. **Yonsei Medical Journal**, v. 51, p. 151-163, 2010.

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

- 16. CACCIAPUOTI, F. Natriuretic peptide system and cardiovascular disease. **Heart Views**, v. 11, p. 10-15, 2010.
- 17. WEBER, K. T. Fibrosis and hypertensive heart disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 15, p. 264-272, 2000.
- 18. ROSSI, M. A. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. **Journal of Hypertension**, v. 16, p. 1031-1041, 1998.
- 19. ZORNOFF, L. A. M.; CICOGNA, A. C.; PAIVA, S. A. R.; SPADARO, J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 3, p. 371-378, 2002.
- 20. CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 189-205, 2007.
- 21. SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 211-242, 2007.
- 22. BROOKS, W. W.; BING, O. H. L.; ROBINSON, K. G.; SLAWSKY, M. T.; CHALETSKY, D. M.; CONRAD, C.H. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. **Circulation**, v. 96, p. 4002-4010, 1997.
- 23. BRILLA, C. G.; FUNCK, R. C.; RUPP, H. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. **Circulation**, v. 102, p. 1388-1393, 2000.
- 24. PAULETTO, P.; RATTAZZI, M. Inflammation and hypertension: the search for a link. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 850-853, 2006.
- 25. SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 539-552, 2009.
- 26. JIANG, B.; LIAO, R. The paradoxical role of inflammation in cardiac repair and regeneration. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 3, p. 410-416, 2010.
- 27. EMING, S. A.; HAMMERSCHMIDT, M.; KRIEG, T.; ROERS, A. Interrelation of immunity and tissue repair of regeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 517-527, 2009.
- 28. GONZALEZ, A.; RAVASSA, S.; BEAUMONT, J.; LOPEZ, B.; DIEZ, J. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. **Journal of American College of Cardiology**, v. 58, p. 1833-1843, 2011.
- 29. FRANGOGIANNIS, F. G. The immune system and cardiac repair. **Pharmacology Research**, v. 58, p. 88-111, 2008.
- 30. DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOGIANNIS, N. G. The extracelular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, p. 504-511, 2010.
- 31. VIRDIS, A.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? **Hypertension**, v. 12, p. 181-187, 2003.
- 32. TORRE-AMIONE, G.; et al. Tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. **Circulation**, v. 93, p. 104, 1996.
- 33. MATSUMORI, A. cytokines in myocarditis and cardiomyophaties. **Current Opinion in Cardiology**, v. 11, p. 302-309, 1996.

- 34. IKONOMIDIS, I.; ANDREOTTI, F.; ECONOMOU, E.; STEFANADIS, C.; TOUTOUZAS, P.; NIHOYANNOPOULOS, P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. **Circulation**, v. 100, p. 793-798, 1999.
- 35. RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; PFEFFER, M.; SACKS, F.; LEPAGE, S.; BRAUNWALD, E. Elevation of tumor necrosis factor-α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. **Circulation**, v. 101, p. 2149-2153, 2000.
- 36. PASCERI, V.; et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. **Circulation**, v. 103, p. 2531-2534, 2001.
- 37. OIKONOMOU, E.; TOUSOULIS, D.; SIASOS, G.; ZAROMITIDOU, M.; PAPAVASSILIOU, A. G.; STEFANADIS, C. The role of inflammation in heart failure: new therapeutic approaches. **The Hellenic Journal of Cardiology**, v. 52, p. 30-40, 2011.
- 38. ELSTER, S. K.; BRAUNWALD, E.; WOOD, H. F. A study of C-reactive protein in the serum of patients with congestive heart failure. **American Heart Journal**, v. 51, p. 533-541, 1956.
- 39. LEVINE, B.; KALMAN, J.; MAYER, L.; FILLIT, H. M.; PACKER, M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 236-241, 1990.
- 40. CHUNG, E. S.; PACKER, M.; LO, K. H.; FASANMADE, A. A.; WILLERSON, J. T. Randomized double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the Anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. **Circulation**, v, 107, p. 3133-3140, 2003.
- 41. MANN, D. L.; et al. Target anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). **Circulation**, v. 109, p. 1594-1602, 2004.
- 42. MAHMUD, A.; FEELY, J. Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. **Hypertension**, v. 46, p. 1118-1122, 2005.
- 43. SIWIK, D. A.; CHANG, D. L.; COLUCCI, W. S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. **Circulation Research**, v. 86, p. 1259-1265, 2000.
- 44. DESWAL, A.; PETERSEN, N. J.; FELDMAN, A. M.; WHITE, B. G.; MANN, D. L. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). **Circulation**, v. 3, p. 2055-2059, 2001.
- 45. MAUVIEL, A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 53, p. 288-295, 1993.
- 46. NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 378, p. 151-160, 1997.
- 47. TORRE-AMIONE, G.; et al. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. **Circulation**, v. 92, p. 1487-1493, 1995.
- 48. MUEGGE, K.; et al. Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1. **Science**, v. 246, p. 249-251, 1989.
- 49. OLD, L. J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, v. 230, p. 630-632, 1985.
- 50. KAPADIA, S. R.; ORAL, H.; LEE, J.; NAKANO, M.; TAFFET, G. E.; MANN, D. L. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. **Circulation Research**, v. 81, p. 187-195, 1997.

- 51. HAMID, T.; et al. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappa B and inflammatory activation. **Circulation**, v. 119, p. 1386-1397, 2009.
- 52. DIWAN, A.; et al. Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. **Circulation**, v. 109, p. 262-268, 2004.
- 53. KRISHNAMURTHY, P.; RAJASINGH, J.; LAMBERTS, E.; QIN, G.; LOSORDE, D. W.; KISHORE, R. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR. **Circulation Research**, v. 104, p. 9-18, 2009.
- 54. DUNLAY, S. M.; WESTON, S. A.; REDFIELD, M. M.; KILLIAN, J. M.; ROGER, V. L. Tumor necrosis factor-alpha and mortality in heart failure: a community study. **Circulation**, v. 118, p. 625-631, 2008.
- 55. FRANCIS, G. S. TNF-alpha and heart failure. The difference between proof of principle and hypothesis testing. **Circulation**, v. 99, p. 3213-3214, 1999.
- 56. KUBOTA, T.; MCTIERNAN, C. F.; FRYE, C. S.; DEMETRIS, A. J.; FELDMAN, A. M. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis fator-alpha causes lethal myocarditis in transgenic mice. **Journal of Cardiac Failure**, v. 3, p. 117-124, 1997.
- 57. BOZKURT, B.; et al. Pathophysiologically relevant concentration of tumor necrosis factoralpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. **Circulation**, v. 97, p. 1382-1392, 1998.
- 58. YOKOYAMA, T.; VACA, L.; ROSSEN, R. D.; DURANTE, W.; HAZARIKA, P.; MANN, D. L. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 2303-2312, 1993.
- 59. SIVASUBRAMANIAN, N.; et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. **Circulation**, v. 104, p. 826-831, 2001.
- 60. EMONARD, H.; GRIMAUD, J. A. Matrix metalloproteinases. **Cellular and Molecular Biology**, v. 36, p. 131-153, 1990.
- 61. COKER, M. L.;.; et al. Matrix metalloproteinases expression and activity in islated myocytes after neurohormonal stimulation. **Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, p. 543-551, 2001.
- 62. ROSANO, L.; et al. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 61, p. 8340-8346, 2001.
- 63. TSURUDA, T.; et al. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. **Circulation Research**, v. 91, p. 1127-1134, 2002.
- 64. SCHULZ, R. Activation of MMP-2 as key event in oxidative stress injury to the heart. **Frontiers en Bioscience**, v. 14, p. 699-716, 2009.
- 65. WOESSNER Jr., J. F.; NAGASE, H. **Introduction to the matrix metalloproteinases (MMPs):** matrix metalloproteinases and TIMPs. New York, NY: Oxford University Press, 2000. p. 1-10.
- 66. GAJARSA, J. J.; KLONER, R. A. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. **Heart Failure Review**, v. 16, p. 13-21, 2011.
- 67. ROLDAN, V.; et al. Matrix metaloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. **American Heart Journal**, v. 156, p. 85-91, 2008.

- 68. BERGMAN, M. R.; TEERLINK, J. R.; MAHIMKAR, R.; LI, L.; ZHU, B. Q.; NGUYEN, A.; DAHI, S.; KARLINER, J. S.; LOVETT, D. H. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. Heart **Circulation Physiology**, v. 292, p. 1847-1860, 2007.
- 69. WANG, G. Y.; BERGMAN, M. R.; NGUYEN, A. P.; TURCATO, S.; SWIGART, P. M.; RODRIGO, M. C.; SIMPSON, P. C.; KARLINER, J. S.; LOVETT, D. H.; BAKER, A. J. Cardiac transgenic matrix metalloproteinase-2 expression directly induces impaired contractility. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 688-696, 2006.
- 70. MATSUSAKA, H.; et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. **Hypertension**, v. 47, p. 711-717, 2006.
- 71. RUTSCHOW, S.; LI, J.; SCHULTHEISS, H. P.; PAUSCHINGER, M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 646-656, 2006.
- 72. BOMFIM, G. F.; SZASZ, T.; CARVALHO, M. H. C.; WEBB, R. C. The toll way to hypertension: role of the innate imune response. **Endocrinology & Metabolic Syndrome**, v. 8, p. 1-8, 2011.
- 73. BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factor I chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1066-1071, 1997.
- 74. FRANTZ, S.; et al. Absence of NF-kappa B subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. **FASEB**, v. 20, p. 1918-1920, 2006.
- 75. WU, K. I.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Nuclear factor kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 57, p. 261-268, 2011.
- 76. RODRIGUEZ-ITURBE, B.; FERREBUZ, A.; VANEGAS, V.; QUIROZ, Y.; MEZZANO, S.; VAZIRI, N. D. Early and sustained inhibition of nuclear factor-κB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, p. 51-57, 2005.
- 77. JUNIOR, L. F. S. **O** papel do receptor toll-like **4** na aterogênese em modelo experimental de aterosclerose. 2008. 101 f. Tese (Doutorado em Ciência) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 78. HA, T.; LI, Y.; HUA, F.; MA, J.; GAO, X.; KELLEY, J.; ZHAO, A.; HADDAD, G. E.; WILLIAMS, D. L.; BROWDER, I. W.; KAO, R. L.; LI, C. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. **Cardiovascular Research**, v. 68, p. 224-234, 2005.
- 79. 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, p. 76-83, 2008.
- 80. VERSTAK, B.; HERTZOG, P.; MANSELL, A. Toll-like receptor signaling and the clinical benefits that lie within. **Journal of Inflammation Research**, v. 56, p. 1-10, 2007.
- 81. FRANTZ, S.; ERTL, G.; BAUERSACHS, J. Mechanisms of disease: toll-like receptors in cardiovascular disease. **Nature Clinical Practice**, v. 4, p. 444-454, 2007.
- 82. YANG, X.; CORIOLAN, D.; MURTHY, V.; SCHULTZ, K.; GOLENBOCK, D. T.; BEASLEY, D. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient toll-like receptor 4 signaling. **Heart Circulation Physiology**, v. 289, p. 1069-1076, 2005.
- 83. BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signaling. **Nature**, v. 430, p. 257-263, 2004.

- 84. SANDRI, S.; RODRIGUEZ, D.; GOMES, E.; MONTEIRO, H. P.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Is serum amyloid A endogenous TLR4 agonist?. **Journal of Leukocyte. Biology**, v. 83, p. 1174-1180, 2008.
- 85. PASTERKAMP, G.; KEULEN, J. K. V.; KLEIJN, D. P. V. Role of toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 34, p. 328-334, 2004.
- 86. LIU, N.; LIU, J. T.; JI, Y. Y.; LU, P. P. C-reactive protein triggers inflammatory responses partly via TLR4/IRF3/NF-Kb signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells. **Life Sciences**, v. 87, p. 367-374, 2010.
- 87. MICHELSEN, K. S.; DOHERTY, T. M.; SHAH, P. K.; ARDITI, M. Role of toll-like receptors in atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 95, p. 96-97, 2004.
- 88. CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIA, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 14, p. 41-48, 2007.
- 89. FRANTZ, S.; KOBZIK, L.; KIM, Y-D.; FUKAZAWA, R.; MEDZHIYOV, R.; LEE, R. T.; KELLY, R. A. Toll 4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 104, p. 271-280, 1999.
- 90. TIMMERS, L.; JOOST, P. G.; SLUIJTER, J.; KEULEN, K. V.; HOEFER, I. E.; NEDERHOFF, M. G. J.; GOUMANS, M. J.; DOEVENDANS, P. A.; ECHTELD, C. J. A. V.; JOLES, J. A.; QUAX, P. H.; PIEK, J. J.; PASTERKAMP, G.; KLEIJN, D. P. V. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction **Circulation Research**, v. 102, p. 257-264, 2008.
- 91. CHA, J.; WANG, Z.; AO, L.; ZOU, N.; DINARELLO, C. A.; BANERJEE, A.; FULLERTON, D. A.; MENG, X. Cytokines link toll-like receptor 4 signaling to cardiac dysfunction after global myocardial ischemia. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 85, p. 1678-1685, 2008.
- 92. EISSLER, R.; SCHMADERER, C.; RUSAI, K.; KUHNE, L.; SOLLINGER, D.; LAHMER, T.; WITZKE, O.; LUTZ, J.; HEEMANN, U.; BAUMANN, M. Hypertension augments cardiac toll-like receptor 4 expression and activity. **Hypertension Research**, p. 1-8, 2010.
- 93. SALES, M. L.; SCHREIBER, R.; FERREIRA-SAE, M. C.; FERNANDES, M. N.; PIVETA, C.; CIPOLLI, J. A.; CALIXTO, A.; MATOS-SOUZA, J. R.; GELONEZE, B.; FRANCHINI, K. G.; NADRUZ, W. Jr. The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. **Clinica Chimica Acta.**, v. 411, p. 744-748, 2010.
- 94. HA, T.; HUA, F.; LI, Y.; MA, J.; GAO, X.; KELLEY, J.; ZHAO, A.; HADDAD, G. E.; WILLIAMS, D. L.; BROWDER, W.; KAO, R. L.; LI, C. Blockade of MyD88 attenuates cardiac hypertrophy and decreases cardiac myocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in vivo. **American Journal of Physiology Heart Physiology.**, v. 290, p. 985-994, 2006.
- 95. MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D. E.; TSUKUMO, D. M.; ANHE, G.; AMARAL, M. E.; TAKAHASHI, H. K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H. C.; CARVALHEIRA, J. B.; BORDIN, S.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 359-370, 2009.
- 96. PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.
- 97. EHRENTRAUT, H.; WEBER, C.; EHRENTRAUT, S.; SCHWEDERSKI, M.; BOEHM, O.; KNUEFERMANN, P.; MEYER, R.; BAUMGARTEN, G. The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. **European Journal of Heart Failure**, v. 13, p. 602-610, 2011.

- 98. BOMFIM, G. F.; DOSSANTOS, R. A.; OLIVEIRA, M. A.; GIACHINI, F. R.; AKAMINE, E. H.; TOSTES, R. C.; FORTES Z. B.; WEBB, C.; CARVALHO, M. H. C. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**, v. 122, p. 1-9, 2012.
- 99. VERDECCHIA, P.; et al. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. **Circulation**, v. 97, p. 48-54, 1998.
- 100. WEBER, K. T.; et al. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. **American Journal of Cardiology**, v. 65, p. 1-7, 1990.
- 101. PÓVOA, R.; BOMBING, M. T. N. Regressão da hipertrofia ventricular esquerda e a terapia anti-hipertensiva. **Revista Brasileira de Hipertensão.**, v. 15, p. 90-93, 2008.
- 102. CHEUNG, P. Y.; SAWICKI, G.; WOZNIAK, M.; WANG, W.; RADOMSKI, M. W.; SCHULZ, R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. **Circulation**, v. 101, p. 1833-1839, 2000.
- 103. LINDSEY, et al. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. **Circulation**, v. 105, p. 753-758, 2002.
- 104. ROHDE, L. E.; DUCHARME, A.; ARROYO, L. H.; AIKAWA, M.; SUKHOVA, G. H.; LOPEZ-ANAYA, A.; MCCLURE, K. F.; MITCHELL, P. G.; LIBBY, P.; LEE, R. T. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. **Circulation**, v. 99, p. 3063-3070, 1999.
- 105. YARBROUGH, W. M.; et al. Selective targeting and timing of matrix metalloproteinase inhibition in post-myocardial infarction remodeling. **Circulation**, v. 108, p. 1753-1759, 2003.
- 106. TESSONE, A.; FEINBERG, M. S.; BARBASH, I. M.; REICH, R.; HOLBOVA, R.; RICHMANN, M.; MARDOR, Y.; LEOR, J. Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 19, p. 383-390, 2005.
- 107. VILLARREAL, F. J.; GRIFFIN, M.; OMENS, J.; DILLMANN, W.; NGUYEN, J.; COVELL, J. Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. **Circulation**, v. 108, p. 1487-1492, 2003.
- 108. RIZZI, L.; CASTRO, M. M.; PRADO, C. M.; SILVA, C. A.; FAZAN JR, R.; ROSSI, M. A.; TANUS-SANTOS, J. A.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinase inhibition improves cardiac dysfunction and remodeling in 2-kidney, 1-clip hypertension. **Journal of Cardiac Failure**, v. 16, p. 599-608, 2010.
- 109. SAKATA, Y.; YAMAMOTO, K.; MANO, T.; NISHIKAWA, N.; YOSHIDA, J.; HORI, M.; MIWA, T.; MASUYAMA, T. Activation of matrix metalloproteinases precedes left ventricular remodeling in hypertensive heart failure rats its inhibition as a primary effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor. **Circulation**, v. 109, p. 2143-2149, 2004.
- 110. WONG, Y.; SETHU, C.; LOUAFI, F.; HOSSAIN, P. Lipopolysaccharide regulation of toll-like receptor-4 and matrix metalloprotease-9 in human primary corneal fibroblasts invest ophthalmol. **Invertigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, p. 2796-2803, 2011.
- 111. LANDMESSER, U. F. L.; WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodeling. **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 519-527, 2009.
- 112. ABBATE, A.; et al. Anakinra a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 117, p. 2670-2683, 2008.

- 113. STRAINO, S.; et al. Protective effects of parecoxib, a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, in postinfarction remodeling in the rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 50, p. 571-577, 2007.
- 114. MA, K. K.; OGAWA, T.; BOLD, A. J. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 36, p. 505-513, 2004.
- 115. PORTER, K. E.; TURNER, N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology & Therapeutics**, 2009, 123: 255-278.
- 116. DIBBS, Z. I.; DIWAN, A.; NEMOTO, S.; DEFREITAS, G.; ABDELLATIF, M.; CARABELLO, B. A.; SPINALE, F. G.; FEUERSTEIN, G.; SIVASSUBRAMANIAN, N.; MANN, D. L. Targeted overexpression of transmembrane tumor necrosis factor provokes a concentric cardiac hypertrophic phenotype. **Circulation**, v. 108, p. 1002-1008, 2003.
- 117. YOKOYAMA, T.; NAKANO, M.; BEDNARCZYK, J. L.; McINTYRE, B. W.; ENTMAN, M.; MANN, D. L. Tumor necrosis factor-α provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. **Circulation**, v. 95, p. 1247-1252, 1997.