GISELE FACHOLI BOMFIM

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TIPO TOLL 4 NA REATIVIDADE
VASCULAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

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

São Paulo
2012

GISELE FACHOLI BOMFIM

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TIPO TOLL 4 NA REATIVIDADE
VASCULAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Bomfim, Gisele Facholi.

Participação do receptor tipo Toll 4 na reatividade vascular em ratos espontaneamente hipertensos / Gisele Facholi Bomfim. -- São Paulo, 2012.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Participação do receptor tipo Toll na hipertensão arterial experimental.

Versão do título para o inglês: Role of Toll-like receptor 4 in vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats.

1. Hipertensão 2. Endotélio vascular 3. Receptores imunológicos
I. Carvalho, Profa. Dra. Maria Helena Catelli de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0130/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gisele Facholi Bomfim.

Título da Tese: Participação do receptor tipo Toll 4 na reatividade vascular em ratos espontaneamente hipertensos.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: esp@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 Scialanti Ceravolo, Rosana Marangoni, Fernando Paranaíba 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

Dedico este trabalho aos meus heróis e heroínas:

Aos meus pais, **Hermelino Pereira Bonfim e Maria Inês Facholi Bonfim**, pelo amor incondicional, por se fazerem tão presentes na minha vida e por sempre me incentivarem na minha trajetória. As minhas irmãs **Graziely e Gabriela**, pelo carinho, amizade, amor e apoio.

Ao **Douglas Antoniassi**, meu grande amor, por estar sempre ao meu lado, pelo grande companheirismo e por me apoiar a seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

"A felicidade só é real quando compartilhada" Christopher McCandless

Sou muito privilegiada em ter pessoas tão maravilhosas na minha vida. O que seria de mim sem minha família e meus grandes amigos, pessoas estas que me apoiaram, me aguentaram, ouviram minhas lamentações, me aconselharam, comemoraram minhas vitórias e minhas alegrias e jamais me abandonaram. Por isso tentarei agradecer pelo menos a grande maioria das pessoas que fazem parte da minha vida, no entanto tenho certeza que faltará eu citar alguns nomes, os quais já peço que me perdoem. Apenas quero que entendam o quanto cada um de vocês foram e continuam sendo importantes para mim.

Agradeço à Deus,

Obrigada Senhor por estar sempre ao meu lado me abençoando durante toda essa jornada e por sempre me dar forças pra continuar. "Se Deus é por nós quem será contra nós?" (Romanos 8:31-32)

Aos ratos que deram suas vidas para realização deste trabalho e para a evolução da ciência.

À minha orientadora Dra Maria Helena Catelli de Carvalho, por ter me recebido de braços abertos e por aceitar uma estranha chegando em seu laboratório propondo uma nova linha de pesquisa. Obrigada pelos grandes e valiosos ensinamentos de vida e por me ajudar a realizar esse grande sonho da melhor maneira possível.

À Dra Zuleica Bruno Fortes pelo seu exemplo de dedicação e postura e pelo apoio e estrutura dos laboratórios.

Ao Dr Clinton Webb, pela sua calorosa recepção em seu laboratório na Georgia Health Sciences University e por ser sempre muito prestativo e pronto para ensinar e discutir ciência.

À Dra Eliana Akamine pelos seus valiosos conselhos e apoio que ajudaram a construir essa tese. Agradeço ainda sua agradável amizade e convivência.

À Dra Rita Tostes pelos seus ensinamentos e incentivo em várias etapas deste trabalho.

À minha família sempre tão acolhedora e presente que se eu pudesse escolher não mudaria ninguém. Agradeço em especial aos meus avós Altino Facholi (em memória e Italina Ferrari Facholi, pela sua atenção, amor e por não medir esforços para manter nossa família unida. Agradeço, ainda, a parte da minha família que mora em São Paulo, tia Neguita, tio Rubens, Thays, Fábio Eduardo, Thatiane, Rafael e Gustavo, pela acolhida e apoio sempre.

As minhas companheiras Simone Sartoretto, Karla Santiago e Renee Oliveira pela alegria, conversas, cumplicidade, pela grande amizade e por tornarem os anos em São Paulo muito mais fáceis e agradáveis.

À Fernanda Giachini, Victor Lima, Fernando Carneiro, Zidônia Carneiro e Theodora Szasz por serem minha família nos EUA, obrigada pelo imenso auxílio, acolhida, ensinamentos e convivência, sem vocês teria sido muito mais difícil.

Obrigada aos amigos do laboratório de Hipertensão e Diabetes: Cinthya Echem e Clara Martins, por serem minhas companheiras dos receptores Toll e pela confiança, ao Tiago Januário, pelas conversas filosóficas, a Luciana Giaquinto, pelo carinho e incentivo, Núbia Lobato, pelas risadas e exemplo de luta, Fernando Filgueira, por sua sinceridade e conselhos. Vanessa Oliveira, pela "caçada de assunto", a Beatriz Ponzio, pela companhia e conversas, a Eveline, pelo exemplo de dedicação, a Graziela Ceravolo, pelos ensinamentos, Graziela Hagihara, pelos momentos de descontração, Veronica Rennó, pelas novas experiências e ao André Colaço, por sua luta constante.

Obrigada aos amigos que fiz em Augusta, Georgia: Stella Goloupoulou, Brandi Wynne, Hicham Labazi, Kênia Nunes, Hyehun Choi, Safia Ogbi, Inger, Jason, Katie Splitter, Wagner Reis, Vinicia Biancardi, Any Freitas, Maria Alicia Sepulveda e Trevor Hardigan. Muito obrigada a cada um de vocês por terem me acolhido tão bem em um país diferente e tornaram o ano que passei longe tão enriquecedor e especial.

Aos técnicos do laboratório: Ana Rita Araújo, Marta Rodrigues, Manoel Rocha, Maria Alice Araújo e Antonio Garcia pela amizade, auxílio, momentos de descontração e ajuda nos experimentos.

As minhas amigas Rosangela dos Santos Eichler e sua família e Maria Aparecida de Oliveira pelo exemplo de caráter, dedicação, força e amizade. Essas conhecem.

Às queridas Sônia Leite e Andrea Bordenali por me ajudarem a manter o equilíbrio e por me ensinarem tanto sobre a vida.

Aos amigos de outros laboratórios: Sônia Buratto e sua família, por serem sempre tão carinhosos, Gisele Couto, Camila Wenceslau, Dra Luciana Rossoni, Livia Camargo, Ana Alice Dias, Sidnei, Aline e Marina Tuppy obrigada pela convivência e conselhos.

Às secretarias Mônica, Camila, Selma e Julieta pelas conversas, risadas e auxílio na burocracia.

À família Santos Antoniassi: Wanderley, Neuza, Cléo, Luiz Henrique, Isabella e Amador, obrigada pelo carinho, incentivo e acolhimento.

Aos meus amigos de Barra do Garças - MT por fazerem parte da minha criação e minha essência e aos amigos de Campo Grande - MS por participarem da minha formação e despertarem meu interesse na pesquisa, desculpe não citar o nome de cada um, mas deixo registrado meu agradecimento profundo por serem tão importantes na minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado e de doutorado-sanduiche e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro.

Ufa, quantos agradecimentos, mas quero que saiba que cada um de vocês foram fundamentais para a construção não apenas deste trabalho, mas da minha personalidade e das minhas escolhas: MUITO OBRIGADA.

Let It Be

The Beatles

*When I find myself in times of
trouble
Mother Mary comes to me
Speaking words of wisdom:
Let it be*

*And in my hour of darkness
She is standing right in front of
me
Speaking words of wisdom:
Let it be*

*Let it be, let it be
Let it be, let it be
Whisper words of wisdom:
Let it be*

*And when the broken hearted
people
Living in the world agree
There will be an answer:
Let it be*

*For though they may be parted
there is
Still a chance that they will see
There will be an answer:
Let it be*

*Let it be, let it be
Let it be, let it be
There will be an answer:
Let it be*

*Let it be, let it be
Let it be, let it be
Whisper words of wisdom:
Let it be*

*Let it be, let it be
Let it be
Yeah let it be
Whisper words of wisdom:
Let it be*

*And when the night is cloudy
There is still a light that shines
on me
Shine on until tomorrow
Let it be*

*I wake up to the sound of music
Mother Mary comes to me
Speaking words of wisdom
Let it be*

"Não entendo. Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender. Entender é sempre limitado. Mas não entender pode não ter fronteiras. Sinto que sou muito mais completa quando não entendo. Não entender, do modo como falo, é um dom. Não entender, mas não como um estado de espírito. O bom é ser inteligente e não entender. É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida. É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice. Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco. Não demais: mas pelo menos entender que não entendo."

Clarice Lispector

RESUMO

Bomfim GF. Participação do receptor tipo toll 4 na reatividade vascular em ratos espontaneamente hipertensos. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Estudos tem demonstrado que tanto a imunidade inata quanto a adaptativa contribuem com o desenvolvimento da hipertensão arterial. O mecanismo pelo qual a hipertensão estimula a resposta imune é desconhecido, mas envolve a presença de ligantes endógenos que ativam o sistema imune. O receptor tipo Toll 4 (TLR4) pertence à imunidade inata e pode ser ativado por ligantes exógenos (LPS) e endógenos levando a ativação do fator nuclear κ B e a transcrição de genes da resposta inflamatória. Sabendo-se que a hipertensão arterial é caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica, ocasionada, principalmente, pela disfunção vascular e tendo em vista que trabalhos tem relacionado TLR4 com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, nós hipotetizamos que o TLR4 está superativado na hipertensão e que seu bloqueio diminui a pressão arterial e melhora a resposta contrátil em artérias mesentéricas de resistência de ratos SHR (ratos espontaneamente hipertensos). Primeiramente, vimos que o TLR4 está mais expresso em artérias mesentéricas de resistência de SHR com 15 semanas (hipertensos) do que em Wistar com 15 semanas e SHR com 5 semanas (normotensos). Em vista disso, SHR e Wistar com 15 semanas foram tratados com anticorpo anti-TLR4 (1 μ g/dia) por 15 dias via i.p., a fim de bloquearmos a ativação deste receptor. Para descartarmos a hipótese de ligação inespecífica, os SHR e Wistar adultos foram tratados com anticorpo inespecífico IgG. Demonstramos que após o tratamento dos SHR com anti-TLR4 houve diminuição na expressão protéica do TLR4, MyD88, na fosforilação da P38 e NF- κ B p65, além da secreção de IL-6 quando comparado com o grupo SHR IgG, mostrando que o tratamento foi eficaz em diminuir a ativação do TLR4. Vimos ainda que os SHR tratados com anti-TLR4 tiveram uma redução na pressão arterial versus SHR IgG. No estudo funcional, usando artérias mesentéricas de resistência e miógrafos para estudo da tensão isométrica, observamos que a resposta máxima ao KCl e à noradrenalina (NA), que encontram-se aumentadas em SHR IgG foram normalizadas após o tratamento com anti-TLR4. Esta resposta parece depender das enzimas Cox 1, Cox 2 e do NF- κ B. De fato a liberação de tromboxano A₂ e a expressão de Cox-2 foram menores em artérias de SHR anti-TLR4 do que em SHR IgG. Outro fator que avaliamos foi a modulação da resposta contrátil à NA pelo óxido nítrico (NO), usando-se o inibidor da óxido nítrico sintase, L-NAME. Verificamos que houve aumento na resposta contrátil à NA de ambos grupos Wistars e diminuição no SHR IgG sendo que o tratamento com anti-TLR4 melhorou, mas não corrigiu essa resposta em SHR. Isto nos sugere que nos SHR IgG há menor biodisponibilidade de NO ocasionada provavelmente pelo desacoplamento da eNOS, visto que vimos que a expressão desta enzima esta diminuída e a geração de espécies reativas de oxigênio após estímulo com NA esta aumentada nos SHR IgG. Desta forma, estes resultados sugerem que a imunidade inata, representada pelo TLR4, está associada com o aumento da pressão arterial e com a disfunção vascular presente na hipertensão arterial.

Palavras-chave: Hipertensão arterial. Receptor tipo Toll 4. Reatividade vascular.

ABSTRACT

Bomfim GF. Role of Toll-like receptor 4 in vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. [Ph.D. thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Studies have demonstrated that both the adaptive and innate immunity contributes to the development of hypertension. The mechanism by which hypertension stimulates the immune response is unknown, but involves endogenous ligands that activate the immune system. Toll like receptor 4 (TLR4) belongs to the innate immunity and can be activated by exogenous (LPS) and endogenous ligands leading to activation of nuclear factor κ B and transcription of genes of the inflammatory response. In view that hypertension is characterized by increased peripheral vascular resistance, caused mainly by vascular dysfunction, and considering that studies have linked TLR4 to the development of cardiovascular diseases, we hypothesized that TLR4 is overactive in hypertension and its blockade decreases blood pressure and improves contractile response in mesenteric resistance arteries of SHR (spontaneously hypertensive rats). At first, we found that TLR4 is more expressed in mesenteric resistance arteries of SHR with 15 weeks (hypertensive) than in Wistar 15 weeks and SHR at 5 weeks (normotensive). In view of this, SHR and Wistar rats with 15 weeks were treated with anti-TLR4 (1 μ g/dia) intraperitoneally for 15 days in order to block this receptor. To discard the possibility of unspecific binding, the SHR and Wistar controls were treated with nonspecific IgG antibody. We demonstrated that protein expression of TLR4, MyD88, phosphorylation of p38 and NF κ B p65 and secretion of IL-6 were decreased in SHR after anti-TLR4 treatment compared to SHR IgG, showing the efficacy of treatment in block TLR4 activation. We have also seen that the SHR treated with anti-TLR4 had a reduction in blood pressure versus SHR IgG. In functional studies using mesenteric resistance arteries and miographs to study the isometric tension, we observed that the maximum response to KCl and noradrenaline (NA), which are increased in SHR-IgG were normalized after treatment with anti-TLR4. It seems to depend on enzymes Cox-1, Cox-2 and NF- κ B. In fact, the release of thromboxane A2 and Cox-2 expression were lower in the arteries of anti-TLR4 treated SHR than in SHR IgG. Another factor evaluated was the modulation of the contractile response by nitric oxide (NO), using the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME. There was an increase in contractile response to NA in both Wistar groups and decreased in SHR IgG, and the treatment with anti-TLR4 improved, but did not correct this response in SHR. This suggests a deficiency in NO bioavailability in SHR IgG, probably caused by uncoupling eNOS, in view that we found the expression of this enzyme is decreased and the generation of reactive oxygen species after stimulation with NA is increased in SHR IgG. Thus, these results suggest that the innate immunity, represented by TLR4 is associated with increased blood pressure and vascular dysfunction in hypertension.

Keywords: Arterial hypertension. Toll-like receptor 4. Vascular reactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema ilustrando as principais vias de sinalização ativadas pelo TLR4 na célula.	32
Figura 2 - Expressão protéica do receptor TLR4 em ratos Wistar e SHR com 15 semanas (A); SHR com 5 e 15 semanas (B); e Wistar e SHR com 17 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	45
Figura 3 – Expressão protéica do MyD88 e TRIF em artérias mesentéricas de SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	46
Figura 4 - Concentração sérica das citocinas IL-6 (A), TNF-α (B) e IL-10 (C) em ratos SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias....	47
Figura 5 - Expressão protéica das MAPquinas, P38 (A) e ERK 1/2 (B) na forma fosforilada e total em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	48
Figura 6 - Pressão arterial caudal dos ratos Wistar (A) e SHR (B) com 15 semanas antes e após o tratamento com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	49
Figura 7 - Pressão arterial direta sistólica (A) e diastólica (B) e frequência cardíaca (C) dos ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	50
Figura 8 - Curvas concentração-resposta para acetilcolina (A) e nitroprussiato de sódio (B) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	52
Figura 9 - Resposta contrátil induzida pelo cloreto de potássio 120mM (KCl) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	53
Figura 10 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar (A) e SHR (B) de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	54
Figura 11 - Resposta máxima à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de SHR e Wistar com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias, na ausência ou presença de SC-560 (10nM, inibidor da COX-1, A) e NS-398 (100 mM, inibidor da COX-2, B).	56

Figura 12 - Expressão protéica das enzimas Cox-1 (A) e Cox-2 (B) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG e anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	57
Figura 13 - Concentração de tromboxano (TXB2, metabólito estável do TXA2, A) e 6-keto-PGF1α (produto estável da prostaciclina, B) liberada por artérias mesentéricas, incubadas com noradrenalina, de Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	58
Figura 14 - Resposta máxima á noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias, na ausência ou presença de pirrolidina (100 µM, inibidor do NF-κB).	59
Figura 15 - Expressão protéica do NF-κB p65 na forma fosforilada e total em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	60
Figura 16 - Resposta máxima à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos SHR e Wistar de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias, na ausência ou presença de L-NAME (100 µM, inibidor da NOS).	61
Figura 17 - Expressão protéica da enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	62
Figura 18 - Determinação da geração de EROs em cortes de artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	64
Figura 19 - Determinação da geração de EROs basal e sob estímulo de noradrenalina (10µM), em cortes de artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	65
Figura 20 - Esquema representativo da conclusão do trabalho, mostrando a sinalização do TLR4 em células da artéria mesentérica de resistência de SHR. As setas vermelhas indicam diminuição do fator representado após o tratamento com anti-TLR4.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Peso, pressão arterial sistólica, diastólica e caudal e frequência cardíaca dos ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1µg/dia) por 15 dias.	51
Tabela 2 - Efeito do tratamento com IgG ou anti-TLR4 sobre a reatividade de artérias mesentéricas de resistência isoladas de Wistar e SHR ao cloreto de potássio (KCl), noradrenalina (NA) na presença e ausência de inibidores, acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS).	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
BCA	Ácido bicincônínico
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BPM	Batimento por minuto
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Aglomerado de diferenciação)
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CMLV	Células do músculo liso vascular
CO ₂	Dióxido de carbon
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CpG	Citosina precedendo guanina
Damps	<i>Damage associated molecular pathern</i> (Padrões moleculares associados à danos)
DCV	Doença Cardiovascular
DHE	Diidroetidina
DNA	Ácido dextribonucleico
DOCA-sal	Desoxicorticosterona e salina
DTT	Ditiotreitol
EC ₅₀	Concentração que promove 50% da resposta máxima
EDCF	Fatores contráteis derivados do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fatores relaxantes derivados do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EH	Etídeo
EHO	2-hidroxietídeo
ELISA	Ensaio imunoenzimático

eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
epm	Erro padrão da média
ERK1/2	Quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina – 1
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FC	Frequência cardíaca
FMN	Mononucleotídeo de flavina
g	Gramas
h	Horas
HA	Hipertensão Arterial
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (Proteína de Choque Térmico)
IC	Circunferência interna
ICAM	Molécula de adesão intercelular
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IgG	Imunoglobulina G
IKK	<i>Inhibitor of kappa B kinase</i>
IL	Interleucina
IRAK	<i>interleukin-1 receptor associated kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
JNK	Quinase do terminal c-jun
K ⁺	Potássio
KCL	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
kPa	KiloPascal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	Éster de N-metil-L-arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
LRR	Repetições ricas em leucina
MAL	<i>MyD88-adaptor like</i>
MAPk	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimioatraente à monócito 1

mg	Miligrama
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
MMP	Metaloproteinase
mN	mili Newton
ms	milisegundo
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear <i>kappa B</i>)
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ²⁻	Ânion superóxido
PA	Pressão Arterial
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i> (Padrões moleculares associados à patógenos)
PBS	Tampão de fosfato salina
PCR	Proteína C reativa
pD ₂	Logaritmo negativo da EC ₅₀
PG	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaciclina
PMSF	Fluoreto de fenilmetil-sulfonil
R _{MAX}	Resposta máxima
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SARM	<i>Sterile-α and heat-armadillo motif protein</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency mice</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio

Ser	Serina
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
TAB	<i>TAK binding protein</i>
TAK	<i>TGF-β activated kinase</i>
TBS-T	<i>Tris buffer saline + Tween-20</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th-17	Célula T <i>helper</i> 17
Thr	Treonina
TLR	<i>Toll like receptor</i> (receptores tipo Toll)
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TIRAP	<i>TIR-associated protein</i>
TP	Receptor do tromboxano
TRIF	<i>Toll-receptor activator of interferon</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAM	<i>Toll-receptor-associated molecule</i>
TX	Tromboxano
VCAM	Proteína de adesão celular vascular
VEGF	Fator de crescimento vascular do endotélio
Vs.	Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Hipertensão Arterial	23
1.2 Resposta Imune e hipertensão arterial	27
1.3 Receptores tipo Toll - TLR	30
1.4 TLRs nas doenças cardiovasculares	33
2 OBJETIVO	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Medida da pressão arterial caudal	37
3.2 Medida da pressão arterial direta	37
3.3 Tratamento com anticorpo anti-TLR4	38
3.4 ELISA (ensaio imunoenzimático)	38
3.5 Reatividade em artéria mesentérica de resistência	39
3.5.1 Protocolo experimental	40
3.6 Quantificação Protéica por <i>Western Blotting</i>	41
3.6.1 Extrato total	41
3.6.2 “Immunoblotting”	41
3.7 Dosagem do tromboxano B₂ e do 6-keto prostaglandina F_{1α}	42
3.8 Determinação da geração de EROs em cortes de artérias mesentéricas ...	43
3.9 Análise estatística	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Expressão do receptor TLR4 em artérias mesentéricas de resistência	44
4.2 Expressão protéica das moléculas envolvidas na sinalização do TLR4, MyD88 e TRIF, em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4	46
4.3 Detecção da produção das citocinas TNF-α, IL-6 e IL-10	47
4.4 Efeito do tratamento com anti-TLR4 ou IgG sobre a fosforilação da P38 e da ERK 1/2 em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR	48
4.5 Medida da pressão arterial caudal e direta, e da frequência cardíaca	49
4.6 Avaliação do relaxamento dependente e independente do endotélio em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4	52
4.7 Avaliação da resposta contrátil ao KCl e à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4	53

4.8 Papel das enzimas COX-1 e COX-2 na resposta à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4	55
4.9 Análise da expressão protéica das enzimas Cox-1 e Cox-2 e da liberação dos prostanóides tromboxano e prostaciclina pelas artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4	57
4.10 Papel do NF-κB na resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4	59
4.11 Análise da expressão protéica da subunidade 65 do NF-κB fosforilado e total em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4	60
4.12 Participação do fator relaxante NO na modulação da resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4	61
4.13 Análise da expressão protéica da eNOS total em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4	62
4.14 Geração de EROs em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4	64
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICES	86
APÊNDICE A - Bomfim, GF, DosSantos RA, Oliveira, MA, Giachini, FR, Tostes RCA, Fortes ZB, Webb RC, Carvalho MHC. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. Clinical Science, 2012; 122 (11): 535-43	86
APÊNDICE B – Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC. The toll way to hypertension: role of the innate immune response. Endocrinology & Metabolic Syndrome. 2011; S:8: 1-8.	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial (HA) é considerada o principal fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV), condição responsável por uma a cada três mortes no mundo (1). Quando persistente, a hipertensão pode contribuir para o desenvolvimento de alterações nos vasos sanguíneos renais, cardíacos e cerebrais e resultar em aumento na incidência de insuficiência renal, coronariopatia, insuficiência cardíaca e acidente vascular cerebral. Cerca de um quarto da população adulta mundial, aproximadamente um bilhão de pessoas, tem HA, e estima-se um aumento de 29% na prevalência desta condição - 1,56 bilhão – até 2025 (2). Em algumas cidades brasileiras, a prevalência da HA pode chegar a 30% da população adulta.

Segundo a “American Heart Association” e a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, o indivíduo é considerado hipertenso quando apresenta níveis de pressão sistólica acima de 140 mmHg e diastólica 90 mmHg (3). Dentre os fatores envolvidos na fisiopatogênese da hipertensão arterial, uma parte significativa é atribuída a fatores genéticos. Apesar do fenótipo final de elevação da pressão arterial ser similar entre pacientes, os mecanismos genéticos e ambientais determinantes da hipertensão arterial são normalmente complexos e heterogêneos. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial incluem tabagismo, hiperlipidemia, diabetes, história familiar de DCV, sedentarismo, estresse psicológico, dieta rica em sal, idade, sexo, dentre outros (4). Mas, em geral, a elevação da pressão arterial é causada por uma combinação de várias anormalidades (multifatorial) (5). É importante esclarecer que os valores de pressão arterial de humanos é semelhante ao de ratos e camundongos, sendo que os valores considerados normais ou hipertensos para humanos são os mesmos para estes roedores.

De uma forma geral, a pressão arterial é determinada pelo fluxo sanguíneo e a resistência, segundo a lei de Ohm adaptada para fluidos dinâmicos. O fluxo

sanguíneo depende do débito cardíaco e do volume sanguíneo, enquanto a resistência é determinada pelo estado contrátil de artérias de resistência ou arteríolas de todo o corpo. Estes componentes da pressão arterial estão sujeitos a uma variedade de influências regulatórias. Dessa forma, as causas da hipertensão arterial requer a consideração de muitos sistemas que contribuem com a regulação da pressão arterial, incluindo a vasculatura, o sistema nervoso central e periférico e o rim, que secretam vários hormônios reguladores (revisado por (6)).

Na fase crônica da hipertensão arterial observa-se aumento da resistência periférica total com débito cardíaco normal. O controle da resistência periférica total é um fator importante na regulação da pressão arterial (PA). A resistência periférica é controlada principalmente pelo tônus vascular e depende da viscosidade do sangue, velocidade do fluxo, comprimento do vaso e da relação parede/luz. O tônus vascular basal é controlado por hormônios ou autacóides específicos, podendo ser modulado pelo sistema nervoso simpático, catecolaminas circulantes, metabólitos locais (O_2 , CO_2), hiperosmolaridade e agentes vasoativos (7). Alguns desses agentes atuam de maneira endócrina e neuroendócrina como a angiotensina II (Ang II), a vasopressina e as catecolaminas circulantes.

Na hipertensão arterial ocorrem modificações funcionais e estruturais nos vasos sanguíneos. Segundo alguns autores as modificações estruturais seriam responsáveis pelo aumento do tônus basal (8), e incluem hipertrofia da camada média muscular e hiperplasia, que causam espessamento da parede vascular com redução do raio interno e remodelamento dos elementos teciduais presentes no vaso sanguíneo (9).

As células do músculo liso vascular (CMLV) exercem um importante papel no controle da resistência vascular periférica. O estado contrátil tônico das CMLV é o primeiro determinante para o diâmetro do lumen arterial, o que afeta diretamente o fluxo e a pressão sanguínea. Ajustes fisiológicos do tônus arteriolar dependem do estado contrátil das CMLV, as quais respondem a uma variedade de influências locais e sistêmicas (10).

Além das CMLV outras células que são essenciais nos vasos sanguíneos são as células endoteliais, as quais participam da manutenção da homeostase e

hemodinâmica. Elas regulam ativamente o tônus vascular em condições fisiológicas, respondendo tanto a forças mecânicas quanto a mediadores neurohumorais, e liberando uma variedade de fatores contráteis e relaxantes derivados do endotélio (11, 12). Os fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) compreendem a angiotensina II (Ang II), endotelina, espécies reativas de oxigênio (EROs) e prostanoídes vasoconstritores. Os fatores relaxantes (EDRFs) incluem óxido nítrico, prostaciclina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). O equilíbrio entre a formação e/ou liberação desses mediadores proporciona o controle do tônus vascular e da pressão sanguínea (11).

Somente as modificações estruturais não explicam a diferença na resposta a agentes vasopressores observada em modelos de hipertensão experimental. Vasos sanguíneos de animais hipertensos apresentam maior reatividade aos agentes pressores do que vasos de animais normotensos (13, 14). Este aumento de reatividade é associado à maior sensibilidade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstritores, sendo que em estados crônicos de hipertensão arterial as modificações estruturais intensificam o aumento da reatividade (15). Além disso, a disfunção do endotélio vascular, observada em doenças como hipertensão arterial, aterosclerose e hiperlipidemia, pode contribuir para o aumento da responsividade a agentes vasoconstritores, bem como para a redução da resposta a agentes vasodilatadores (16).

Sabe-se que na hipertensão arterial ocorre aumento da resistência vascular periférica associado com disfunção endotelial, e a perda da função modulatória exercida pelos fatores derivados do endotélio parece ter participação crítica no desenvolvimento desta condição (17). As alterações da função endotelial na hipertensão têm sido atribuídas ao desequilíbrio na geração e/ou liberação de mediadores envolvidos na contração e no relaxamento vascular (16, 18).

Em ratos SHR, a disfunção endotelial é atribuída à contração endotélio-dependente mediada pela liberação de fatores contráteis. Esta contração endotélio-dependente envolve a produção de EROs, a ativação da ciclooxigenase 1 e 2 (Cox-1 e Cox-2) endotelial, a difusão de um fator contrátil derivado do endotélio e

subsequente estimulação de receptores tromboxano A₂ (TP) localizado em células do músculo liso vascular (19).

Um mecanismo importante no menor relaxamento dependente do endotélio se deve à menor biodisponibilidade do NO. Isto ocorre devido a diminuição na síntese de NO, provavelmente em decorrência ao desacoplamento da eNOS que passa a gerar EROs, ou aumento na degradação do NO devido, principalmente, a sua interação com o ânion superóxido (O₂⁻) para formar peroxinitrito (ONOO⁻) (20, 21). As EROs, dessa forma, possuem um papel importante na disfunção endotelial, por isso estão presentes em diversos modelos de hipertensão e colaboram, ainda, nos vasos, com o aumento da contratilidade, crescimento e apoptose das células do músculo liso vascular, lipoperoxidação e aumento da deposição de proteínas da matrix extracelular (21-23).

O complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) tem sido considerado a principal fonte de geração de EROs na vasculatura, apesar de existirem outras fontes como a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, xantina oxidase, NOS, COX e lipooxigenase (24). A NADPH oxidase esta constitutivamente ativa em todas as camadas da parede celular, gerando EROs intracelularmente de forma lenta e contínua em resposta a um determinado agente (25). Muitos fatores atuam na modulação desta enzima, entre eles fatores humorais, como citocinas, angiotensina II, fatores de crescimento e agentes vasoativos e fatores físicos, como estiramento e tensão de cisalhamento (26).

A célula endotelial pode ser ativada pela estimulação de diferentes agentes, tais como as citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β), cujos níveis encontram-se elevados na hipertensão (27, 28). As citocinas induzem genes que sintetizam outros peptídeos da família das citocinas e de vários mediadores, como prostanóides, leucotrienos, NO, bradicinina, EROs e fator ativador de plaquetas, sendo que todos estes podem afetar a função vascular. Podem regular, também, a expressão e a função de proteínas como, moléculas de adesão, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), componentes da matrix extracelular e fatores de crescimento, os quais colaboram com a hipertrofia e disfunção vascular descrita na hipertensão. Algumas

citocinas tem sido clinicamente associadas com o aumento da rigidez arterial, o qual é um fator de risco independente para eventos cardiovasculares em pacientes hipertensos (29). Elas possuem uma importante participação nos danos renais e na resistência vascular associada com a hipertensão arterial (30). Podem, ainda, induzir vasoconstrição por si e diminuir ou aumentar a resposta vasoconstritora induzida por diferentes agonistas (31). Muitos dos efeitos das citocinas na reatividade vascular dependem tanto do tempo de exposição, o qual influenciará a secreção de mediadores, quanto do leito vascular e da patologia estudada (30).

As citocinas pró-inflamatórias estão ganhando muito destaque como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em pacientes e animais hipertensos (32). O TNF- α , por exemplo, está envolvido na ativação de neutrófilos, aumento da permeabilidade vascular e ainda no crescimento e migração de células do músculo liso vascular. Além disso, o TNF- α aumenta a expressão de moléculas de adesão, de outras citocinas e das metaloproteinases (33). Estudos relacionando esta citocina com hipertensão têm demonstrado que o antagonista do TNF- α , etanercept, reduz a hipertensão em modelo de ratos hipertensos por dieta rica em frutose e por infusão de angiotensina II, prevenindo principalmente a disfunção vascular (34, 35).

1.2 Resposta Imune e hipertensão arterial

A designação de DCV como um processo inflamatório crônico é utilizada por vários autores (36-38). De fato, diversos estudos têm demonstrado que os níveis circulantes de moléculas inflamatórias, como citocinas, quimiocinas, HSP60 e 70, Ang II e proteína C reativa, encontram-se elevados em SHR e em pacientes hipertensos (39-41). Em alguns casos, a detecção dos níveis plasmáticos de proteína C reativa pode colaborar com o prognóstico da hipertensão em pacientes (42). Estas moléculas inflamatórias são responsáveis pelo recrutamento e ativação de leucócitos, sendo essenciais na resposta imune, no controle de infecções e no reparo de tecidos lesionados. Os leucócitos ativados podem contribuir para a

hipertensão arterial por influenciar a resistência microvascular e por liberar EROS e enzimas proteolíticas ou ambas, levando à lesão da parede vascular (43).

Na década de 90, Polly Matzinger introduziu um novo conceito no ramo da imunologia, conhecido como “danger model” (44). Em resumo, este modelo hipotetiza que as células da resposta imune inata não são ativadas apenas pelos micro-organismos infecciosos, mas principalmente pelos sinais de perigo provenientes a partir de células do hospedeiro danificadas, tecidos lesionados ou estresse metabólico. Dessa forma, a função primária do sistema imune é detectar e proteger o hospedeiro contra o perigo gerado por danos celulares e teciduais. Segundo essa autora sinais de alerta podem ser constitutivos ou induzidos, intracelular ou secretados, ou até mesmo uma parte da matrix extracelular. As células que morrem pelo processo de programação normal e usualmente são eliminadas antes de se desintegrarem, acabam por não gerar sinais de perigo. No entanto células que morrem por necrose liberam substâncias e produtos intracelulares que funcionam como sinais de perigo. Os sinais de perigo induzidos podem incluir qualquer substância gerada ou modificada por células danificadas ou estressadas. Essas substâncias são denominadas DAMPs (do inglês, damage associated molecular pattern ou, em português, padrões moleculares associados à danos) e são reconhecidas principalmente pelos TLRs, iniciando e ativando a resposta imune inata (45).

Vários DAMPs já foram descritos na literatura, como ativadores do TLR4, e muitos destes estão presentes na hipertensão arterial (46). A angiotensina II, por exemplo, ativa CMLV e induz uma resposta inflamatória parcialmente via TLR4 (47). A proteína C reativa também ativa TLR4 em CMLV (48). Outro exemplo são as proteínas do choque térmico (HSP) as quais já foram descritas terem os níveis aumentados em pacientes hipertensos e muitos fragmentos da HSP60 e HSP70 são imunogênicos e podem induzir sinais inflamatórios de uma forma TLR4 dependente (49).

A participação direta das células do sistema imune, principalmente da resposta imune adaptativa tem sido amplamente estudada na hipertensão (50). Em 2007, Guzik e colaboradores demonstraram que camundongos com ausência de

células T e B eram resistentes ao aumento da pressão arterial após infusão com ang II por 14 dias (51). O mesmo foi demonstrado nestes camundongos tratados com DOCA-sal (desoxicorticosterona e salina), outro modelo experimental de hipertensão arterial. A transferência de linfócitos T, mas não de linfócitos B restaurou a hipertensão nestes animais, demonstrando que as células T são essenciais para o desenvolvimento da hipertensão nos modelos descritos. Outro grupo demonstrou ainda que camundongos SCID (do inglês, severe combined immunodeficiency mice), os quais não possuem linfócitos B e T, quando infundidos com angiotensina II, não apresentaram aumento na pressão arterial e apresentaram reduzida retenção de sódio (52).

Após a descrição da participação dos linfócitos T na hipertensão, foi investigado qual tipo de linfócito T estaria envolvido nessa condição. Dessa forma, foi apresentado no High Blood Pressure Conference em Orlando em 2011 um trabalho mostrando que camundongos que não possuíam linfócitos T CD8 é que apresentaram resistência a hipertensão induzida pela infusão de ang II quando comparado com o controle C57BL/6J. Em contraste, a infusão de ang II aumentou a pressão arterial de camundongos que não possuíam linfócitos T CD4 comparado com camundongos sem linfócito T CD8 e selvagem. Este trabalho descreve a importante contribuição dos linfócitos T CD8 e não dos T CD4 na hipertensão induzida por Ang II.

A participação da citocina pró-inflamatória IL-17 produzida pelo linfócitos Th17 na hipertensão também foi estudada. Foi observado que há um aumento na secreção de IL-17 pelas células T isoladas de camundongos infundidos com Ang II e que camundongos knockout para IL-17 apresentaram reduzida elevação da pressão arterial após infusão com ang II comparado com os selvagens (53).

Outro tipo de linfócito T que vem sendo estudado na hipertensão é o T regulador. Esse tipo de célula atua suprimindo a resposta imune adaptativa e a inata, como medida de controle e conclusão do processo inflamatório (54). Recentemente, Barhoumi e colaboradores demonstraram que a transferência de células T reguladoras em camundongos preveniu a hipertensão induzida por Ang II, os danos vasculares e a infiltração de células do sistema imune (55). É importante ressaltar

que a maioria destes trabalhos descritos usaram como modelo de hipertensão a infusão com ang II ou DOCA-sal, no entanto a importância da resposta imune adaptativa não foi investigada em outros modelos de hipertensão como o SHR.

Em conjunto, estes trabalhos descrevem a participação da resposta imune adaptativa na hipertensão, no entanto a importância da resposta imune inata, responsável pelo reconhecimento e apresentação do antígenos para os linfócitos, foi pouco investigada nesta enfermidade.

1.3 Receptores tipo Toll – TLR

Os TLRs representam uma importante família de proteínas transmembrânicas caracterizadas estruturalmente pela presença de repetições ricas em leucina (LRR) e cisteínas na região extracelular, e um domínio TIR intracelular. São capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sejam em bactérias, fungos ou protozoários. Sabe-se que alguns TLRs reconhecem especificamente certos PAMPs, tais como: lipoproteínas bacterianas, ácido lipotéico e zimosan são reconhecidos por TLR2 em cooperação com TLR1 ou TLR6; RNA dupla fita por TLR3; LPS por TLR4; flagelinas por TLR5; RNA fita simples por TLR7 e TLR 8; e sequências de CpG de DNA bacteriano por TLR9 (56). No entanto como já descrito, além dos micro-organismos, diversos trabalhos na literatura mostraram que os TLRs também são ativados por moléculas endógenas ou DAMPs. Atualmente já foram identificados 10 tipos de TLRs em humanos (TLR1-10) e 13 tipos em camundongos e ratos (TLR1-13), e todos eles apresentam pequenas diferenças nas cadeias de aminoácidos que compõe as proteínas que os formam.

A via de sinalização predominante usada pelos TLRs resulta na ativação do NF- κ B. Como 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 (do inglês, myeloid differentiation factor 88), TIRAP (do inglês, TIR-associated protein) também conhecida como MAL (do inglês, MyD88-adaptor-like), TRAM (do inglês, Toll-receptor-associated molecule), e SARM (do

inglês, sterile- α and heat/armadillo motif protein), sendo que a função dessa última molécula ainda não está bem definida. O tipo de sinalização depende do uso seletivo de diferentes combinações de moléculas adaptadoras. As ativações dependentes da molécula MyD88 (uma molécula compartilhada por quase todos os TLRs, menos o TLR3) é iniciada com a facilitação da associação da MyD88 com a IRAK4 (do inglês, IL-1 R-associated kinase). Isto favorece a fosforilação da IRAK1, que permite a ligação da molécula TRAF6 (do inglês, TNF receptor associated factor 6) ao complexo. A ligação da TRAF6, por sua vez, ativa TAK1 (do inglês, TGF- β -activated kinase) que faz um complexo com TAB1 (do inglês, TAK binding protein) e TAB2. Após a formação do complexo, TAK1 ativa o complexo IKK que leva a ativação de NF- κ B. Simultaneamente, TAK1 ativa membros da família das MAPquinas (MAPk), como ERK 1/2 (quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular), JNK (do inglês, JUN N-terminal kinase) e p38, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (revisado por (57)).

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

MyD88 = proteína adaptadora “myeloid differentiation primary response gene (88)”; TIRAP = TIR-associated protein; MAL= MyD88-adaptor-like; TRAM = Toll-receptor-associated molecule; TRIF = Toll-receptor-associated activator of interferon; IRAK = IL-1 R-associated kinase; TRAF6 = TNF receptor associated factor 6; ERK1/2 e p38 = MAPkinases; IRF3 = interferon regulatory factor 3; NFκB = fator de transcrição nuclear κB; COX = ciclo-oxigenase; EROs = espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Bomfim (2012)

Os genes que são expressos em resposta ao TLR codificam proteínas importantes onde se incluem citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12), moléculas de adesão endotelial (E-selectina), substâncias microbidas (óxido nítrico e EROs) e moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) (58). As EROs geradas a partir da ativação do TLR4 provém, principalmente da NADPH oxidase e da mitocôndria (59). Os TLRs são expressos em diversas células e órgãos, como macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, do músculo liso vascular, células epiteliais, no coração, rins, fígado, pulmão, cérebro dentre outros.

Outra importante molécula inflamatória que também é ativada através do estímulo do TLR4 é a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) (60). Esta isoforma induzível da enzima COX cataliza a formação de prostaglandinas e tromboxano, os quais medeiam a resposta inflamatória. A ativação de TLR4 induz a expressão de COX-2, regulando a produção, principalmente, de prostaciclina.

1.4 TLRs nas doenças cardiovasculares

Os ligantes endógenos capazes de ativar os TLRs estão relacionados, principalmente, até o momento, com a ativação dos TLR2 e TLR4 (61). Os estudos relacionando os TLR e as doenças cardiovasculares (DCV) também destacam a participação apenas destes dois receptores (62). Desse modo, o reconhecimento e a ativação dos TLRs por moléculas endógenas pode ser um importante elo entre as doenças cardiovasculares e a ativação do sistema imune. Já foi descrito o envolvimento dos TLRs nas DCVs como, aterosclerose, infarto do miocárdio, disfunção cardíaca em sepse e insuficiência cardíaca congestiva, e em desordens metabólicas, como diabetes e obesidade, sendo que o bloqueio do TLR parece ter um efeito protetor nestas condições (revisado por (62)).

A aterosclerose é caracterizada por uma inflamação local crônica na parede vascular a qual resulta no acúmulo de lipídios e macrófagos no espaço subendotelial. Por se tratar de uma doença inflamatória, alguns trabalhos com animais knockout para TLR4 e TLR2 e estudos epidemiológicos em humanos com polimorfismo no gene que codifica o TLR4 relatam a importância deste receptor na formação da neoíntima e no início e progressão da doença aterosclerótica (63, 64). A ativação do TLR4 na aterosclerose se deve a ligantes exógenos (como bactérias) e ligantes endógenos (LDL oxidado).

Em condições como a obesidade e o diabetes, níveis elevados de ácidos graxos livres estão relacionados com a patogênese tanto da inflamação quanto da resistência a insulina em vários tecidos, incluindo células endoteliais. A ativação do TLR4 por LPS em adipócitos atenua a sinalização à insulina e reduz a captação da

glicose dependente da insulina através de mecanismos mediado por NF- κ B e TNF- α (65). O processo inflamatório induzido pelo excesso de consumo de nutrientes também está relacionado com o mecanismo envolvendo TLR4. Em 2007, Kim (66) e colaboradores demonstraram que o consumo de uma dieta rica em gordura saturada por camundongos pode induzir inflamação vascular e resistência à insulina através da ativação local do TLR4 no endotélio, e que esta resposta pode diminuir a produção de NO e favorecer a progressão da aterosclerose.

No infarto do miocárdio há aumento da expressão de TLR4 no miocárdio quando a doença está avançada, mas ainda não se sabe o mecanismo envolvido (67). O TLR4 também tem importante participação na isquemia/reperfusão. Foi demonstrado que animais knockout para TLR4 estão protegidos contra danos de isquemia-reperfusão após 2 h (68) e 24 h após a reperfusão (69). Nestes camundongos observou-se ainda que os níveis de citocinas pró-inflamatórias e células inflamatórias estão reduzidos após a reperfusão (69).

A ativação de TLR4 por LPS promove um fenótipo pró-inflamatório nas células do músculo liso de aorta de camundongos e de humanos caracterizada pela produção de IL-1 α , IL-6 e MCP-1 e ativação de NF- κ B (70). Observou-se também, em células do músculo liso da aorta humana, aumento da produção de NO, IL-8 e VEGF (fator de crescimento vascular do endotélio), e da expressão de ICAM-1 e VCAM-1, sendo que o uso do anticorpo anti-TLR4 é capaz de inibir a síntese destas moléculas (71).

Ha e colaboradores em 2005 desenvolveram um dos primeiros estudos que associaram elevação da pressão arterial com TLR4, focando nos danos cardíacos (72). Eles demonstraram que camundongos knockouts para TLR4 submetidos a coarctação de aorta por 2 semanas e que desenvolveram aumento da pressão arterial apresentaram redução da hipertrofia cardíaca quando comparado aquela do controle selvagem. Na clínica, já foi demonstrado que o polimorfismo Asp299Gly no gene do TLR4 está significativamente associado com hipertrofia ventricular esquerda em mulheres hipertensas (73).

Outro estudo conduzido por Eissler em 2011 demonstrou que a expressão do TLR4 está aumentada no coração de ratos SHR adolescentes e adultos comparados

com os controles Wistar-kyoto com a mesma idade, sugerindo que apenas um breve período de aumento da pressão é necessária para induzir a expressão do receptor (74). Os autores também demonstraram que em outro modelo de hipertensão usando ratos Wistar-Kyoto tratados com L-NAME, inibidor da NO sintase, houve aumento na expressão de TLR4. O tratamento com ramipril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina II, diminuiu a expressão de TLR4 no coração nestes modelos, mostrando que a expressão de TLR4 pode ser modulada pela pressão arterial.

Há fortes evidências relacionando o envolvimento do TLR4 com a Ang II. A Ang II aumenta a expressão gênica e protéica de TLR4 nas células de músculo liso vascular (CMLV) e no rim *in vivo* e *in vitro*, e esse aumento é inibido com losartan (antagonista AT1). A Ang II ativa o TLR4 através do receptor AT1 e subsequente ERK1/2, caracterizando uma transativação entre o receptor AT1 e o TLR4. Dessa forma o NF- κ B é ativado e translocado do citoplasma para o núcleo para iniciar a expressão de citocinas pró-inflamatórias e MMP-9 (metaloproteinase-9) (47, 75).

Em resumo, conjuntamente, esses dados indicam que o TLR4 pode constituir um mecanismo importante no controle da função cardiovascular em condições patológicas, no entanto ainda há muito o que esclarecer quanto à participação destes receptores na homeostasia e fisiopatologia dos vasos sanguíneos.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho consiste em caracterizar a participação do TLR4 nas alterações vasculares observadas na hipertensão arterial, usando como modelo experimental ratos SHR. Nossa hipótese é a de que o TLR4 encontra-se superativado na hipertensão arterial, e que o bloqueio deste receptor, através do uso do anticorpo anti-TLR4, reduz a pressão arterial, os parâmetros inflamatórios que estão aumentados na hipertensão e melhora a disfunção observada em artérias de resistência de SHR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo para uso de animais de experimentação está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP (protocolo 98/04/CEEA) e pelo comitê institucional para uso e cuidado de animais de experimentação da Georgia Health Sciences University, nos EUA (2011-0353).

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados animais SHR machos com 5 e 15 semanas e ratos controle normotensos Wistar, provenientes do biotério do ICB-I da USP e do Jackson Laboratories (EUA). Os ratos foram mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno, acondicionadas em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso à água e alimento.

3.1 Medida da pressão arterial caudal

A PA caudal foi determinada por método indireto a pletismografia de cauda. Um oclisor e um sensor foram ajustados na porção proximal da cauda do rato, acoplados ao esfigmomanômetro elétrico PE-300 conectado a sistema de transdução (PowerLab/4S, ADInstrument Pty Ltd, Austrália). Os ratos foram aquecidos por 10 minutos a 40 °C e colocados em cilindro de contenção com abertura para a cauda e o focinho. O valor final da PA caudal de cada rato representa a média, em mmHg, de três medidas sequenciais.

3.2 Medida da pressão arterial direta

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (90 e 5 mg/kg, respectivamente, ip). Um cateter de polietileno (PE-50), preenchido com

solução salina heparinizada (100 U/mL), foi inserido na artéria carótida direita e exteriorizado no dorso do animal. Vinte e quatro horas após o cateterismo, o cateter foi conectado a transdutor de pressão (Deltran DPT-100, Utah medical products, Midvale, UT, EUA) ligado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, New South Wales, Austrália), que por sua vez foi acoplado a um sistema de aquisição de dados digital (PowerLab, ADInstruments, New South Wales, Austrália) para aquisição dos registros de pressão arterial e frequência cardíaca em animais acordados.

3.3 Tratamento com anticorpo anti-TLR4

O tratamento com anti-TLR4 realizado neste estudo foi baseado em um trabalho publicado por Milanski et al. em 2009 (76). Os animais Wistar e SHR com 15 semanas foram tratados com anticorpo anti-TLR4 (sc-13591, monoclonal IgG2a, Santa Cruz, EUA) diluído em salina, na dose 1 µg por dia por 15 dias, pela via intra peritoneal. Em um outro lote experimental, animais Wistar e SHR foram submetidos ao mesmo protocolo experimental, no entanto foram tratados com anticorpo IgG2a inespecífico (sc-2026, Santa Cruz, EUA) com o intuito de descartar efeitos inespecíficos do anticorpo. Estes grupos experimentais foram denominados como: Wistar IgG (ratos Wistar tratados com IgG2a inespecífico), Wistar anti-TLR4 (ratos Wistar tratados com anti-TLR4), SHR IgG (SHR tratados com IgG2a inespecífico) e SHR anti-TLR4 (SHR tratados com anti-TLR4).

3.4 ELISA (ensaio imunoenzimático)

Foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante dos animais dos diferentes grupos experimentais utilizados neste estudo. O sangue foi centrifugado por 15 minutos à 3.000 RPM para a separação do soro. A partir do soro coletado foi realizado o ensaio de ELISA para a detecção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 (GE healthcare - EUA). O ensaio de ELISA foi feito conforme instruções do fabricante.

3.5 Reatividade em artéria mesentérica de resistência

Para estudar a reatividade de artéria mesentérica de resistência de ratos Wistar e SHR utilizamos o método descrito inicialmente por Mulvany e Halpern (1977). O leito mesentérico foi removido, posto em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4 °C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11) e o segundo ou terceiro ramo da artéria mesentérica superior (diâmetro interno entre 200 e 300 µm) foi dissecado e cortado em segmentos de 2,0 mm de comprimento. Dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em um miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) para estudo de tensão isométrica. Esse miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador. Já no miógrafo, os vasos foram mantidos em solução de Krebs-Henseleit á 37 °C e 5% de CO₂.

Após um período de estabilização de 15 min, as artérias de resistência foram submetidas ao processo de normalização onde a artéria foi estirada a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno (pressão transmural de 100 mmHg ou 13,3 kPa) (10). Para isso as artérias mesentéricas foram distendidas de forma gradativa e a leitura do micrômetro presente no aparelho e da força aplicada foram registrados a cada ponto. Estes dados foram então convertidos em valores de circunferência interna (µm) e de tensão na parede vascular T (mN/mm), respectivamente. A plotagem da tensão na parede do vaso contra a circunferência interna revela uma curva exponencial. Pela aplicação da curva de isobarra correspondente a 100 mmHg, a IC₁₀₀ é então calculada a partir do ponto de interseção, utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália). A IC₁ (circunferência interna 1) foi calculada a partir da IC₁₀₀ por meio da fórmula $IC_1 = 0,90 \times IC_{100}$, dando uma circunferência interna na qual a produção de força ativa

bem como a sensibilidade do segmento à agonistas foi máxima. O diâmetro interno normalizado foi calculado dividindo-se IC1 por π .

Após 15 min do processo de normalização, as artérias foram contraídas através da administração de cloreto de potássio (KCl, 120 mM), com a finalidade de se avaliar sua integridade funcional. Após cada estímulo com KCl as artérias foram lavadas três vezes usando solução de Krebs à 37 °C. A administração de KCl se repete apenas mais uma vez com intervalo de 15 min entre cada administração, alcançando uma estabilidade na resposta de despolarização do músculo liso ao KCl.

Após 15 min da última administração de 120 mM de KCl, as preparações foram pré-contraídas com noradrenalina (3 μ M), e a integridade do endotélio foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (1 μ M, vasodilatador dependente do endotélio) em induzir no mínimo 80% do relaxamento máximo.

3.5.1 Protocolo experimental

Após período de estabilização por 30 min, curvas concentração-resposta cumulativas à noradrenalina (10 nM - 300 μ M), acetilcolina (10 pM – 30 μ M), e nitroprussiato de sódio (10 pM – 30 μ M) foram realizadas nas artérias de resistência. Para avaliar a modulação da contração induzida pela noradrenalina pelo NO e pelos prostanoídes vasoconstritores, as artérias foram incubadas com L-NAME (inibidor da síntese de NO; 100 μ M), ou SC-560 (inibidor seletivo da COX-1; 1 nM), ou NS-398 (inibidor seletivo da COX-2; 100 mM), 30 min antes da realização da curva concentração-resposta a esse agonista.

Para avaliarmos a contribuição do NF- κ B na contração exercida pela noradrenalina, as preparações foram pré-incubadas com pirrolidina ditiocarbamato (100 μ M, inibidor do NF- κ B) por 30 minutos e em seguida foi realizada curva concentração resposta à noradrenalina.

As curvas concentração-resposta aos vasodilatadores foram realizadas na presença de pré-contração com noradrenalina (10 μ M) em uma concentração capaz de induzir entre 50 a 90% da resposta contrátil induzida pelo KCl.

A contração vascular ao KCl e à noradrenalina foram calculadas como aumento da força (mN), a partir da tensão basal. Os resultados das respostas de relaxamento induzidos pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio foram expressos como porcentagem do relaxamento da pré-contracção induzida pela noradrenalina. Foram calculadas a resposta máxima e EC50 de cada curva, utilizando análise de regressão não linear dessas curvas.

3.6 Quantificação Protéica por *Western Blotting*

3.6.1 Extrato total

Artérias mesentéricas de resistência foram isoladas, congeladas em nitrogênio líquido, pulverizadas e homogeneizadas em tampão lise gelado (coquetel inibidor de proteases Sigma Aldrich) acrescido de ortovanadato de sódio (10 mM), PMSF (fluoreto de fenilmetil-sulfonil, 10 mM) e coquetel inibidor de protease (1%). A pulverização dos tecidos foi realizada com o auxílio de um homogeneizador mecânico. Os extratos teciduais foram centrifugados a 10000 rpm a 4 °C por 60 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, foi quantificado o conteúdo protéico total, utilizando o método de BCA (ácido bicincônínico, Thermo Scientific). As amostras foram então tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotretol, 200 mM), e 40 µg de proteína total foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE 10%) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel havia um marcador com peso molecular de valores estabelecidos.

3.6.2 “Immunoblotting”

A transferência das proteínas separadas no gel para membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente, por meio de aparelho da BioRad por 2 horas a 100 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora

(leite desnatado 5%) a temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram então incubadas individualmente com diferentes anticorpos: anti-TLR4 (1:250, Cell signaling), anti-Cox-1 (1:500, Cell signaling), anti-Cox-2 (1:500, BD), anti-MyD88 (1:750, Cell signaling), anti-TRIF (1:750, Abcam), anti-P38 (1:750, Cell signaling) anti-fosfo P38 (Thr180/Tyr182, 1:750, Cell signaling) anti-ERK1/2 (1:1000, Cell signaling), anti-fosfo ERK1/2 (Thr 202/Tyr204, 1:1000, cell signaling), anti-NFκB p65 (1:400, Cell signaling), anti-fosfo NF-κB p65 (Ser536, 1:400, Cell signaling) e anti-β-actina (1:15000, Sigma). Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (leite 5%), por 18 horas a 4 °C. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes com a solução tampão (TBS-T) por 10 minutos cada vez e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 h em temperatura ambiente. As membranas foram, então, lavadas novamente 3 vezes com intervalos de 10 minutos entre cada lavagem e, logo após, foram incubadas por um minuto com a solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit. A emissão de luz foi detectada e visualizada em auto-radiografias. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (Scion Image). As mesmas membranas foram usadas para verificar a expressão da β-actina, e esta foi usada para normalizar a expressão proteica de cada amostra.

3.7 Dosagem do tromboxano B₂ e do 6-keto prostaglandina F_{1α}

Artérias mesentéricas foram cortadas em 4 mm de comprimento colocadas por 30 minutos em tubos siliconizados contendo 0,5 mL de solução de Krebs á 37 °C. Após este período as artérias foram estimuladas com 100 mM de noradrenalina por 15 minutos. O perfusato derivado dessa incubação foi usado para dosar as prostaglandinas usando um kit de ELISA comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Cinquenta µL das amostras diluídas 2 vezes foram usadas para dosar o tromboxano B₂ (TXB₂, o metabólito estável do tromboxano A₂) e 6-keto

prostaglandina $F_{1\alpha}$ (6-keto $PGF_{1\alpha}$, o metabólito estável da prostaglandina I_2). O ensaio foi conduzido conforme descrito pelo fabricante dos kits. Os valores encontrados foram expressos em picogramas ou nanogramas por miligramas do peso úmido da artéria mesentérica.

3.8 Determinação da geração de EROs em cortes de artérias mesentéricas

A geração de EROs foi determinada utilizando um método qualitativo que envolve a dihidroetidina (DHE), um precursor não fluorescente do brometo de etídio. Na presença de EROs, a DHE é oxidada dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (EH) e 2-hidróxi etídeo (EHO), que têm afinidade pelo DNA nuclear. Os animais foram anestesiados e os segmentos de arteríolas do leito mesentérico foram retirados e incubados em solução de Krebs à 37 °C por 30 minutos na presença ou ausência de noradrenalina 10^{-5} M. Após este período as arteríolas foram rapidamente imersas em meio de congelamento e mantidas a -80 °C. Utilizando-se um criostato (Leica, Alemanha), cortes transversais das arteríolas (20 μ m) foram obtidos e colocados em lâminas silanizadas. Os cortes foram incubados com 100 μ L de DHE 2,5 μ M (30 min, a 37 °C) em câmara úmida e protegidos da luz. Após este período as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Karl Zeiss, Alemanha) equipado com câmera fotográfica apropriada, em aumento de 200x e as fotos foram tiradas após 80 ms de tempo de exposição à fluorescência. A geração de EROS foi determinada usando-se o programa ImageJ onde foi selecionado toda a arteríola e calculado a média de fluorescência emitida.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm). Foi utilizado o teste “t” de Student ou análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer. O nível de significância aceitável foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão do receptor TLR4 em artérias mesentéricas de resistência

A expressão protéica de TLR4 em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar com 15 semanas ($1,0 \pm 0,05$) (Figura 2A) e de SHR com 5 semanas ($1,0 \pm 0,06$) (Figura 2B) foi menor do que a de SHR com 15 semanas (2A: $1,3 \pm 0,1$, 2B: $1,2 \pm 0,02$).

O tratamento com anti-TLR4 por 15 dias em ratos Wistar e SHR com 15 semanas diminuiu a expressão protéica do TLR4 apenas em SHR ($0,98 \pm 0,07$) quando comparado com SHR tratados com IgG ($1,31 \pm 0,11$) (Figura 2C). Não houve diferença na expressão do TLR4 entre os grupos Wistar tratados com IgG (1,0) e anti-TLR4 ($0,75 \pm 0,05$) (Figura 2C).

Figura 2 - Expressão protéica do receptor TLR4 em ratos Wistar e SHR com 15 semanas (A); SHR com 5 e 15 semanas (B); e Wistar e SHR com 17 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

Os gráficos em histograma de barra mostram a análise densitométrica da expressão do receptor. Valores normalizados pela expressão da β-actina. Os valores foram representados como média ± erro padrão. n = 6/grupo. No topo da figura, imagens representativas do *western blot*. * p<0.05 vs. Wistar (A); vs. SHR 5 semanas (B); vs. Wistar IgG (C); # p<0.05 vs. SHR IgG (C).

Fonte: Bomfim (2012)

4.2 Expressão protéica das moléculas envolvidas na sinalização do TLR4, MyD88 e TRIF, em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4

A expressão protéica da molécula adaptadora MyD88 foi reduzida em artérias de SHR tratados com anti-TLR4 ($0,75 \pm 0,03$) em relação ao SHR IgG ($1,0 \pm 0,03$) (Figura 3A). Não foi observado diferença na expressão de TRIF entre os grupos (SHR: IgG – $1,07 \pm 0,01$; anti-TLR4 – $1,15 \pm 0,16$) (Figura 3B).

Figura 3 – Expressão protéica do MyD88 e TRIF em artérias mesentéricas de SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 μ g/dia) por 15 dias.

Os gráficos em histograma de barra mostram a análise densitométrica da expressão das proteínas. Os valores foram normalizados pela expressão da β -actina. No topo da figura, imagens representativas do *western blot*. Os dados foram representados como média $\pm$ erro padrão. n = 5/grupo. * p < 0.05 vs. SHR IgG.

Fonte: Bomfim (2012)

4.3 Detecção da produção das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10

A partir do soro separado do sangue dos animais SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 verificamos que houve uma diminuição na produção de IL-6 após o tratamento com anti-TLR4 (SHR: IgG – $478,7 \pm 44,5$; anti-TLR4 – $337 \pm 23,9$) (Figura 4A). Não foi observada alteração na produção de TNF- α (SHR: IgG – $111,9 \pm 5,3$; anti-TLR4 – $98,0 \pm 9,5$) e IL-10 (SHR: IgG – $0,37 \pm 0,02$; anti-TLR4 – $0,38 \pm 0,01$) entre os dois grupos estudados (Figuras 4B e C). Os valores foram demonstrados em pg/mL.

Figura 4 - Concentração sérica das citocinas IL-6 (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) em ratos SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 μ g/dia) por 15 dias.

Valores representados em pg/mL pela média $\pm$ erro padrão. n = 7-9/grupo. * $p < 0.05$ vs. SHR IgG.

Fonte: Bomfim (2012)

4.4 Efeito do tratamento com anti-TLR4 ou IgG sobre a fosforilação da P38 e da ERK 1/2 em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR

A expressão da forma total das moléculas P38 (Figura 5A) e ERK 1/2 (Figura 5B) foi semelhante entre os grupos estudados. Porém a razão entre a forma fosforilada e a total das duas moléculas está aumentada em artérias de SHR IgG quando comparado com a dos grupos Wistar. O tratamento com anti-TLR4 diminuiu a fosforilação apenas da P38 em artérias de SHR em relação aos SHR IgG (P38 e ERK, respectivamente = Wistar: IgG – $0,99 \pm 0,07$ e $0,7 \pm 0,05$; anti-TLR4 – $1,08 \pm 0,08$ e $1,4 \pm 0,35$; SHR: IgG – $1,8 \pm 0,33$ e $3,5 \pm 0,9$; anti-TLR4 – $0,96 \pm 0,06$ e $3,1 \pm 0,77$).

Figura 5 - Expressão protéica das MAPkinases, P38 (A) e ERK 1/2 (B) na forma fosforilada e total em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 μ g/dia) por 15 dias.

Os histogramas de barra representam a análise densitométrica da expressão das proteínas. Os valores correspondem a razão do P38 ou ERK 1/2 fosforilado e total e foram normalizados pela expressão da β -actina. No topo da figura, imagens representativas do *western blot*. Os dados são representados como média $\pm$ erro padrão. n = 6/grupo. * $p < 0.05$ vs. Wistar IgG; # $p < 0.05$ vs. SHR anti-TLR4.

Fonte: Bomfim (2012)

4.5 Medida da pressão arterial caudal e direta, e da frequência cardíaca

Verificamos inicialmente, através do método de pletismografia, que após o tratamento com anti-TLR4 houve uma diminuição da PA caudal dos ratos SHR quando comparado com aquela antes do tratamento (Figura 6A e B, Tabela 1). Esse dado foi confirmado usando outro método onde foi registrado a PA direta desses animais. Por este segundo método verificamos que tanto a PA sistólica (Figura 7A, Tabela 1) quanto a diastólica (Figura 7B, Tabela 1) estão diminuídas em SHR tratados com anti-TLR4 quando comparado com aquelas de SHR IgG. Não foi observado diferença na frequência cardíaca (Figura 7C, Tabela 1) entre todos os grupos estudados. Vimos ainda que o peso corpóreo dos animais Wistar foi maior do que os SHR, como já é bem relatado pela literatura, no entanto não houve alteração no peso destes ratos após o tratamento com anti-TLR4 (Tabela 1).

Figura 6 - Pressão arterial caudal dos ratos Wistar (A) e SHR (B) com 15 semanas antes e após o tratamento com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

As retas ligam os pontos que correspondem a medida de pressão arterial antes e após o tratamento do mesmo rato. Os valores estão representados em mmHg. A análise estatística foi realizada comparando a média±epm de cada grupo antes e após o tratamento. * $p < 0.05$ vs. SHR anti-TLR4 antes.

Fonte: Bomfim (2012)

Figura 7 - Pressão arterial direta sistólica (A) e diastólica (B) e frequência cardíaca (C) dos ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. A pressão arterial está demonstrada em mmHg e a frequência cardíaca em BPM (batimento por minuto). n = 6/grupo. # p < 0.05 vs. Wistar IgG; * p < 0.05 vs. SHR IgG.

Fonte: Bomfim (2012)

Tabela 1- Peso, pressão arterial sistólica, diastólica e caudal e frequência cardíaca dos ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

	WT IgG		WT anti-TLR4		SHR IgG		SHR anti-TLR4	
Peso (g)	510±15		502±30		334±8 #		327±13 #	
PA sistólica	124.3±1.6		122.1±4.6		196.8±4.3 #		165.7±8.9 *	
PA diastólica	94.1±2.1		93.2±4.1		145.1±5.7 #		121.5±2.1 *	
FC	315.9±16.2		322.6±14.1		359.2±9.0		369.5±13.2	
PA caudal	antes	após	antes	após	antes	após	antes	após
	119.9±2	126.2±2	116.9±1	116.5±2	174.0±3	184.3±3	178.4±2	162.6±3
	.5	.2	.9	.9	.1	.6	.1	.4*

Valores expressos em media ± erro padrão. Os valores de peso estão demonstrados em gramas (g), os de PA em mmHg e os de FC em batimento por minuto. Antes e após = antes ou após o tratamento com IgG ou anti-TLR4. # p<0,05 vs WT IgG; * p<0,05 vs SHR IgG ou antes do tratamento do respectivo grupo.

WT – Wistar;

FC – frequência cardíaca;

PA – pressão arterial

Fonte: Bomfim (2012)

4.6 Avaliação do relaxamento dependente e independente do endotélio em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4

Os relaxamentos dependente e independente do endotélio induzidos pela acetilcolina (Figura 8A) e nitroprussiato de sódio (Figura 8B), respectivamente foram menores em artérias mesentéricas de resistência em ratos SHR quando comparado com aqueles de Wistar (Tabela 2). No entanto não foi observado diferença entre os grupos tratados com IgG em relação aqueles tratados com anti-TLR4.

Figura 8 - Curvas concentração-resposta para acetilcolina (A) e nitroprussiato de sódio (B) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

As artérias mesentéricas foram pré-contráidas com noradrenalina 3µM e curvas concentração-efeito à acetilcolina e NPS foram realizadas. Cada ponto representa a média ± erro padrão. Os valores estão demonstrados em porcentagem de relaxamento à pré-contracção com noradrenalina. n = 4-5/grupo.

Fonte: Bomfim (2012)

4.7 Avaliação da resposta contrátil ao KCl e à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4

A resposta máxima contrátil tanto para o KCl (120mM, Figura 9, Tabela 2) quanto para a noradrenalina (Figuras 10B e C, Tabela 2) foi menor em artérias mesentéricas de resistência de SHR anti-TLR4 quando comparado com aqueles de SHR IgG e Wistar IgG. Não houve diferença nas respostas máximas ao KCl e noradrenalina entre os grupos Wistar (Figuras 9 e 10A).

Figura 9 - Resposta contrátil induzida pelo cloreto de potássio 120mM (KCl) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão. Valores mostrados em mN. n = 12/grupo. * p<0.05 vs. Wistar IgG; # p<0.05 vs. SHR IgG.
Fonte: Bomfim (2012)

Figura 10 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar (A) e SHR (B) de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

Gráfico em histograma de barra representando a resposta máxima á noradrenalina entre os grupos (C). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão. Valores mostrados em mN n = 6-9/grupo. * $p < 0.05$ vs. Wistar IgG; # $p < 0.05$ vs. SHR IgG. Fonte: Bomfim (2012)

4.8 Papel das enzimas COX-1 e COX-2 na resposta à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4

O inibição das enzimas COX-1 e COX-2 através dos compostos SC-560 (Figura 11A, Tabela 2) e NS-398 (Figura 11B, Tabela 2), respectivamente, reduziu a resposta máxima à noradrenalina apenas em artérias de SHR tratados com IgG quando comparado com artérias do mesmo grupo na ausência dos inibidores.

Figura 11 - Resposta máxima à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de SHR e Wistar com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias, na ausência ou presença de SC-560 (10 nM, inibidor da COX-1, A) e NS-398 (100 mM, inibidor da COX-2, B).

Os inibidores foram pré-incubados por 30 minutos antes da realização das curvas. As barras brancas representam a resposta máxima à noradrenalina e as pretas a resposta máxima à noradrenalina na presença do inibidor. Os valores representam a média ± erro padrão. * $p < 0.05$ vs. respectivo grupo na ausência dos bloqueios.

Fonte: Bomfim (2012)

4.9 Análise da expressão protéica das enzimas Cox-1 e Cox-2 e da liberação dos prostanóides tromboxano e prostaciclina pelas artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4

Não foi observado diferença na expressão da enzima Cox-1 (Figura 12A) entre os grupos (Wistar: IgG – 1,0, anti-TLR4 – $1,24 \pm 0,2$; SHR: IgG – $1,1 \pm 0,35$, anti-TLR4 – $1,29 \pm 0,11$). No entanto, vimos que a expressão de COX-2 diminuiu apenas em artérias de SHR tratados com anti-TLR4 ($0,73 \pm 0,07$) quando comparado com as do SHR IgG ($0,99 \pm 0,06$) e não modificou a expressão entre os grupos Wistar (IgG: 1,0; anti-TLR4: $1,02 \pm 0,1$) (Figura 12B). A liberação de tromboxano pelas artérias mesentéricas incubadas com noradrenalina (100 mM) foi menor em SHR após o tratamento com anti-TLR4 ($40,75 \pm 4,3$) em relação aos SHR IgG ($66,44 \pm 4,8$; Wistar: IgG - $25,02 \pm 5,8$, anti-TLR4 - $30,32 \pm 5,5$) (Figura 13A). Não houve diferença na liberação de prostaciclina entre os grupos (Wistar: IgG – $103,2 \pm 43,5$, anti-TLR4 – $85,12 \pm 26,8$; SHR: IgG – $81,2 \pm 29,3$, anti-TLR4 – $54,75 \pm 15$) (Figura 13B).

Figura 12 - Expressão protéica das enzimas Cox-1 (A) e Cox-2 (B) em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG e anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

Os histogramas de barra representam a análise densitométrica da expressão protéica das enzimas COX-1 e -2, e os valores foram normalizados pela β-actina. Nos topo de A e B há imagens representativas dos *western blot*. Os dados foram representados como média ± erro padrão. n = 6/grupo. * p<0.05 vs. SHR IgG.

Fonte: Bomfim (2012)

Figura 13 - Concentração de tromboxano (TXB₂, metabólito estável do TXA₂, A) e 6-keto-PGF_{1α} (produto estável da prostaciclina, B) liberada por artérias mesentéricas, incubadas com noradrenalina, de Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

A concentração dos prostanóides, representada em pg ou ng, foi corrigida pelo peso das artérias. A concentração de noradrenalina usada foi de 10µM . Os dados foram representados como média ± erro padrão. n = 6/grupo. * p<0.05 vs. Wistar IgG; # p<0.05 vs. SHR IgG.

Fonte: Bomfim (2012)

4.10 Papel do NF- κ B na resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4

A incubação das artérias mesentéricas de resistência com pirrolidina, inibidor do NF- κ B, por 30 minutos diminuiu a resposta máxima à noradrenalina apenas no grupo SHR IgG quando comparado com as artérias do mesmo grupo na ausência do inibidor (Figura 14, Tabela 2).

Figura 14 - Resposta máxima á noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 μ g/dia) por 15 dias, na ausência ou presença de pirrolidina (100 μ M, inibidor do NF- κ B).

O inibidor foi pré-incubados por 30 minutos antes da realização das curvas. As barras brancas representam a resposta máxima à noradrenalina e as pretas a resposta máxima à noradrenalina na presença da pirrolidina. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão. * $p < 0.05$ vs. respectivo grupo na ausência do inibidor.

Fonte: Bomfim (2012)

4.11 Análise da expressão protéica da subunidade 65 do NF- κ B fosforilado e total em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4

A razão da expressão da forma fosforilada e total do NF κ B p65 mostrou-se aumentada em artérias mesentéricas de ratos SHR IgG ($1,3 \pm 0,14$) em relação aquelas dos grupos Wistar (IgG: $0,98 \pm 0,03$; anti-TLR4: $0,9 \pm 0,06$). O tratamento com anti-TLR4 em SHR ($0,97 \pm 0,07$) foi eficaz em diminuir a fosforilação deste fator nuclear quando comparado com aquela do SHR IgG (Figura 15).

Figura 15 - Expressão protéica do NF- κ B p65 na forma fosforilada e total em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 μ g/dia) por 15 dias.

Os histogramas de barra mostram a análise densitométrica da expressão do fator nuclear. Os valores correspondem a razão do NF- κ B p65 fosforilado e total e foram normalizados pela expressão da β -actina. No topo da figura, imagens representativas do *western blot*. Os dados foram representados como média $\pm$ erro padrão. n = 6/grupo. * $p < 0.05$ vs. Wistar IgG; # $p < 0.05$ vs. SHR IgG.

Fonte: Bomfim (2012)

4.12 Participação do fator relaxante NO na modulação da resposta contrátil á noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4

A incubação com L-NAME aumentou a resposta contrátil à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência dos grupos Wistar. Em contrapartida, em ratos SHR IgG observamos o oposto, houve uma diminuição da resposta máxima na presença do L-NAME. Não houve diferença na resposta contrátil à noradrenalina no grupo SHR anti-TLR4 após a incubação com o inibidor (Figura 16, Tabela 2).

Figura 16 - Resposta máxima à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de ratos SHR e Wistar de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias, na ausência ou presença de L-NAME (100 µM, inibidor da NOS).

O inibidor foi pré-incubado por 30 minutos antes da realização das curvas. As barras brancas representam a resposta máxima á noradrenalina e as pretas a resposta máxima à noradrenalina na presença do inibidor. Os valores representam a média ± erro padrão. * p<0.05 vs. respectivo grupo na ausência do inibidor.

Fonte: Bomfim (2012)

4.13 Análise da expressão protéica da eNOS total em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4

A expressão da eNOS está reduzida em artérias mesentéricas de ratos SHR IgG ($0,6 \pm 0,05$) em relação a dos grupos Wistar (IgG: 1,0; anti-TLR4: $1,1 \pm 0,13$). O tratamento com anti-TLR4 em SHR ($1,08 \pm 0,1$) foi eficaz em aumentar a expressão desta enzima quando comparado com a do SHR IgG (Figura 17).

Figura 17 - Expressão protéica da enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) em artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 µg/dia) por 15 dias.

Os histogramas de barra mostram a análise densitométrica da expressão da eNOS. Os valores foram normalizados pela expressão da β-actina. No topo da figura, imagens representativas do *western blot*. Os dados foram representados como média ± erro padrão. n = 6/grupo. * p<0.05 vs. Wistar IgG; # p<0.05 vs. SHR IgG.
Fonte: Bomfim (2012)

Tabela 2 - Efeito do tratamento com IgG ou anti-TLR4 sobre a reatividade de artérias mesentéricas de resistência isoladas de Wistar e SHR ao cloreto de potássio (KCl), noradrenalina (NA) na presença e ausência de inibidores, acetilcolina (Ach) e nitroprussiato de sódio (NPS).

	WT IgG		WT anti-TLR4		SHR IgG		SHR anti-TLR4	
	R _{MAX}	pD ₂	R _{MAX}	pD ₂	R _{MAX}	pD ₂	R _{MAX}	pD ₂
KCl	16.1±0.6	-	14.0±0.7	-	21.2±0.9	-	15.0±0.9	-
					*			
NA	19.9±1.4	6.3±0.06	17.1±1.9	6.1±0.08	27.8 ± 1.6 *	6.1 ± 0.04	19.0± 1.7	5.8 ± 0.08 \$
NA + NS398	14.2±1.9	6.0±0.07	14.9±1.7	5.9±0.06	17.1 ± 1.3 #	5.2 ± 0.05 #	15.8 ± 1.1	5.5 ± 0.06
NA + SC560	21.3±3.7	6.1±0.08	19.5±1.9	6.3±0.07	15.9 ± 1.1 #	5.3 ± 0.04 #	18.9 ± 1.5	5.5 ± 0.03
NA + pirrolidina	21.5±1.9	6.1±0.05	17.3±1.5	6.2±0.09	16.4±2.2 #	5.8±0.08 #	18.1±1.7	5.6±0.05
NA + L-NAME	31.2±3.9 #	6.5±0.03	25.7±0.5 #	6.5±0.05	20.9±2.0 *	5.7±0.06	18.0±1.4	5.8±0.06
Ach	94.8±6.4	8.1±1.7	90.8±9.1	8.2±0.08	83.5 ± 9.3	7.0 ± 0.14 *	89 ± 2.8	7.1 ± 0.08 *
NPS	88.1±9.3	7.6±0.7	86.7±9.9	7.4±1.2	89.0 ± 9.3	6.4 ± 0.07 *	89.0 ± 2.8	6.2 ± 0.1 *

Os valores são média ± erro padrão, n = 6-12. **p* < 0.05 vs. SHR + IgG (KCl or NA); # *P* < 0.05 vs Wistar + IgG.

NA = noradrenalina;

WT: Wistar;

NS-398: inibidor da Cox-2;

SC-560: inibidor da Cox-1;

R_{MAX}: resposta máxima;

pD₂: -log EC50.

Fonte: Bomfim (2012)

4.14 Geração de EROs em artérias mesentéricas de resistência de ratos Wistar e SHR com 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4

A geração de EROs basal, ou seja sem estímulos, pelas artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR tratados com IgG ou anti-TLR4 não foi estatisticamente diferente (Wistar: IgG – $22,4 \pm 2,1$; anti-TLR4 – $23,9 \pm 3,9$; SHR: IgG – $21,5 \pm 1,1$; anti-TLR4 – $25 \pm 1,4$) (Figura 18). No entanto após o estímulo das artérias com noradrenalina $10 \mu\text{M}$ por 30 minutos observamos que houve um aumento na geração de EROs apenas no grupo SHR IgG (Figura 19C), não sendo verificado o mesmo nos outros grupos (Wistar: IgG – $25,9 \pm 1,2$; anti-TLR4 – $25,7 \pm 2,5$; SHR: IgG – $28,5 \pm 4,9$; anti-TLR4 – $25,32 \pm 0,73$) (Figuras 19A, 19B e 19D). Valores apresentados em média de fluorescência detectada.

Figura 18 - Determinação da geração de EROs em cortes de artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 ($1 \mu\text{g}/\text{dia}$) por 15 dias.

O gráfico mostra a quantificação da geração de EROs por intensidade de fluorescência em cortes de artérias mesentéricas. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão. $n = 4-5/\text{grupo}$.

Fonte: Bomfim (2012)

Figura 19 - Determinação da geração de EROs basal e sob estímulo de noradrenalina (10 μ M), em cortes de artérias mesentéricas de ratos Wistar e SHR de 15 semanas tratados com IgG ou anti-TLR4 (1 μ g/dia) por 15 dias.

Os histogramas de barra representam a quantificação da geração de EROs por intensidade de fluorescência em cortes de artérias mesentéricas. No topo de cada gráfico imagens representativas da geração de EROs nos cortes de artérias mesentéricas. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. n = 4-5/grupo. * $p < 0.05$ vs. respectivo grupo na presença do estímulo.

Fonte: Bomfim (2012)

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vem sendo descrito e caracterizado o importante envolvimento dos TLRs nas doenças cardiovasculares como, aterosclerose, hipertrofia cardíaca e infarto do miocárdio, sendo que o bloqueio deste receptor apresenta efeito protetor nessas patologias (62, 64, 72, 77). No entanto, a participação destes receptores ainda não foi estudada na hipertensão arterial, principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Vários estudos mostram a ocorrência de alterações e aumento das moléculas (Ang II, HSP60 e 70, PCR, citocinas) envolvidas no processo inflamatório na hipertensão arterial, o que colabora com a disfunção vascular presente nesta doença (38). Além disso, estas moléculas que desencadeiam uma resposta pró-inflamatória podem ser possíveis ativadores ou indutores da expressão dos TLRs no sistema cardiovascular.

Neste projeto, avaliamos, primeiramente, a expressão protéica do TLR4 em artérias mesentéricas de resistência de animais Wistar e SHR em diferentes idades, a fim de verificarmos se a evolução do aumento da PA em ratos SHR é acompanhada da mudança no perfil de expressão de TLR4. Observamos que ratos SHR com 15 semanas, onde já é observado uma PA alta e estável apresentaram uma maior expressão de TLR4 em relação aos Wistar e SHR com 5 semanas, os quais são normotensos. Esse aumento na expressão do TLR4 deve-se, provavelmente, ao processo inflamatório crônico presente na hipertensão arterial desencadeado pelo aumento de DAMPs (HSP70, angiotensina II, fibronectina), presentes nesta condição, e que poderiam estar ativando este receptor (46). Dessa forma, estes resultados sugerem que, em artérias mesentéricas a PA esta relacionada com a modulação da expressão de TLR4.

Nosso trabalho foi pioneiro em demonstrar o aumento de TLR4 em artérias de resistência de animal hipertenso, as principais responsáveis pela manutenção da hipertensão arterial, e relacionar esse achado com a disfunção vascular presente neste modelo. Apenas um artigo na literatura demonstra e discute a participação do TLR4 no modelo SHR, mas focando apenas no aspecto cardíaco (74). Neste artigo, o autor observou uma modulação na expressão do TLR4 no coração pela PA,

usando diferentes modelos de hipertensão como, SHR e ratos tratados com L-NAME, no entanto os autores não avaliaram a expressão arterial deste receptor.

Ao observarmos a super-expressão do TLR4 em artérias de resistência de SHR, propomos um tratamento para inibir a ativação deste receptor e dessa forma avaliar os efeitos gerados por este tratamento. Vimos que o tratamento com anti-TLR4 diminuiu a expressão protéica do TLR4 em artérias mesentéricas de resistência de SHR. De fato, trabalhos tem demonstrado que a ativação do TLR4 resulta em aumento de sua própria expressão (78, 79). Na isquemia do miocárdio, por exemplo, onde há um processo inflamatório, foi mostrado que a expressão do TLR4 está aumentada e que o tratamento com valsartan, um bloqueador do receptor de angiotensina com propriedades anti-inflamatórias, diminuiu a expressão e a ativação do TLR4, demonstrando que o aumento na expressão do TLR4 está relacionado com a sua ativação (80).

Vários mecanismos podem ser responsáveis pelo efeito da menor expressão do TLR4 após o tratamento com anti-TLR4, como por exemplo, a indução da secreção de citocinas anti-inflamatórias, as quais regulam negativamente o receptor. No nosso caso, um potencial mecanismo é que o anticorpo pode estar bloqueando a interação ligante-receptor, o que seria suficiente para regulá-lo de forma negativa. Assim como observado em algumas terapias usando anticorpos, além do bloqueio, a ligação dos anticorpos ao seu alvo também pode atuar internalizando os receptores de superfície, diminuindo desta forma sua expressão e ativação. Há vários exemplos de anticorpos que atuam por este mecanismo de ação incluindo anticorpos para o receptor de IL-6 (tocilizumab – Actemra/RoActemra; Chugai/Roche) e o da α L-integrina (efalizumab – Raptiva/Xanelim; Genentech/Roche/Merck-Serono) (81).

O uso do anticorpo anti-TLR4 vêm sendo testado em algumas condições inflamatórias, como a sepse e a doença intestinal crônica com resultados promissores, mostrando uma diminuição do processo inflamatório (82, 83). Como já descrito, a hipertensão é considerada uma doença inflamatória crônica, com elevados níveis de citocinas pró-inflamatória e de prostanóides derivados da Cox (28). Neste trabalho, nós hipotetizamos que a redução da ativação do TLR4 observada, usando um anticorpo neutralizante *in vivo*, poderia melhorar a inflamação

de baixo grau presente na hipertensão, propondo desta forma um tratamento após o estabelecimento da doença. Nós vimos que o tratamento foi eficaz em diminuir vários parâmetros inflamatórios presentes em SHR, como os fatores da via de sinalização do TLR4, MyD88, MAPk P38, NF- κ B, e os produtos desta sinalização como IL-6, o prostanóide tromboxano e a Cox-2. Dessa maneira, nossos achados sugerem que o TLR4 está associado a inflamação de baixo grau presente na hipertensão.

Considerando que um dos principais mecanismos moleculares envolvido na ativação do TLR4 em doenças não infecciosas é dependente da molécula adaptadora MyD88 (61), a qual envolve a ativação das moléculas IRAK, TRAF, MAPk culminando na fosforilação do NF- κ B (57, 84) fomos avaliar se esta via estava ativada em SHR. Vimos que a provável via de sinalização ativada pelo TLR4 na hipertensão é dependente de MyD88, culminando na fosforilação da P38 e do NF- κ B, tendo em vista que a expressão dessas proteínas estão aumentadas em SHR comparado com ratos Wistar. De forma interessante também observamos que a expressão dessas proteínas diminuíram após o tratamento com anti-TLR4 em SHR, mostrando a eficácia deste tratamento em diminuir a ativação do TLR4 neste modelo.

Já é sabido que os níveis e a atividade das MAPkinases estão aumentadas em modelos de hipertensão, como DOCA-sal e SHR. Essas enzimas participam da sinalização intracelular de transdução iniciado por um estímulo extracelular. (85). A ativação da P38 leva a produção e ativação de mediadores inflamatórios que iniciam o recrutamento de leucócitos e sua ativação, além de estar relacionado com a modulação da intensidade da resposta contrátil em células do músculo liso vascular. Estudos já demonstraram que o TLR4 pode ativar esta kinase culminando na ativação do NF- κ B (86).

Uma vez ativado por estímulos extracelulares, a proteína transcritora NF- κ B transloca do citoplasma para o núcleo e regula a expressão gênica de moléculas inflamatórias. O NF- κ B é composto de subunidades (p50, p65, cRel, p52 e RelB) que podem formar homo- e heterodímeros, sendo que o mais proeminente encontrado na maioria dos tecidos de mamíferos, é o heterodímero p65/p50 (87). A importância do NF- κ B têm sido amplamente demonstrada na patogênese das

doenças cardiovasculares (88). Um estudo mostrou que a ativação deste fator nuclear e a infiltração de células do sistema imune no rim de animais SHR ocorre a partir da terceira semana de idade comparado com Wistar-Kyoto. A inibição do NF- κ B por um longo período, através da pirrolidina, em SHR, resulta na atenuação da inflamação renal intersticial e na prevenção da hipertensão (89).

Tendo em vista a menor fosforilação do NF- κ B o qual induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, fomos avaliar a secreção da IL-6 e TNF- α por já ter sido mostrado que estas citocinas encontram-se em altas concentrações em SHR (28, 90). Vimos uma redução na secreção de IL-6 em SHR após o tratamento com anti-TLR4, a qual foi acompanhada por uma redução na PA destes ratos, sugerindo que a IL-6 é uma importante citocina para a fisiopatologia da hipertensão. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória a qual é secretada por vários tipos celulares, incluindo células endoteliais, células do músculo liso vascular e macrófagos (91, 92). A IL-6 estimula a síntese de algumas proteínas de fase aguda como a proteína C-reativa, proteína amiloide A e o fibrinogênio. Esta citocina promove a proliferação de células do músculo liso vascular presente na hipertensão e na aterosclerose (93). Alguns estudos demonstraram uma associação positiva entre os níveis de IL-6 e o aumento da PA (28, 36). Um trabalho realizado por Lee e colaboradores em 2006 mostraram que camundongos com ausência de IL-6 submetidos a uma dieta com níveis elevados de sal e infundidos com angiotensina II não desenvolveram hipertensão (94). Dessa forma podemos sugerir que uma possível fonte de IL-6 na hipertensão seja através da ativação do TLR4.

Outra questão crucial que avaliamos no presente trabalho foi se o bloqueio do receptor TLR4 nos ratos SHR teria alguma influência sobre a PA. Foi observado, que o tratamento com anti-TLR4 causou redução na PA sistólica e diastólica dos SHR. De fato, uma das principais consequências da ativação do receptor TLR4 é a ativação de NF- κ B que culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias. As principais citocinas liberadas são TNF α e IL-6. Estas citocinas encontram-se elevadas no plasma de animais SHR e humanos hipertensos (27), sendo que elas diminuem a produção e/ou a biodisponibilidade dos fatores relaxantes derivados do endotélio, e estimulam a liberação de fatores contráteis, de estresse oxidativo e

ativam o sistema renina-angiotensina, os quais contribuem para uma maior vasoconstrição, aumento da resistência periférica e aumento da pressão arterial (39, 41). Desse modo, este efeito do bloqueio de TLR4 na PA pode ser devido a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, da ativação do NF- κ B, da geração de EROs, além da menor resposta vasoconstritora, a qual culmina em um menor efeito destes agentes nos vasos e menor resistência periférica.

Apesar de o tratamento usado ao longo deste estudo com anti-TLR4 ser sistêmico, estudamos aqui apenas a participação das artérias mesentéricas de resistência na hipertensão após o tratamento, avaliando a reatividade vascular e alguns parâmetros inflamatórios. No entanto, em vista do efeito sistêmico de diminuição da pressão arterial, mas não normalização da mesma, não podemos descartar a contribuição de outros tecidos e sistemas nesse efeito após o tratamento, como o sistema nervoso autônomo, o rim e o coração, por exemplo, os quais possuem uma participação fundamental no controle da PA. Vimos apenas que o uso do anti-TLR4 parece ter um efeito direto na reatividade vascular e uma resposta anti-inflamatória nestas artérias de resistência que também possuem uma ação direta na manutenção da PA. Sugerimos, dessa forma, uma importante participação do processo inflamatório gerado pelo TLR4 na fisiopatologia da hipertensão juntamente com a regulação de outros órgãos e sistemas neste contexto.

O aumento da resistência vascular periférica a qual é principalmente determinada pelas artérias de resistência e arteríolas é um fator essencial na hipertensão essencial. No aspecto funcional, o aumento da resposta contrátil ou a diminuição do relaxamento nessas artérias aumenta a resistência periférica (10). A inflamação da parede vascular esta associada a disfunção dos vasos sanguíneos. Tendo em vista a diminuição da pressão arterial observada após o tratamento com anti-TLR4 em SHR, nós investigamos se o tratamento poderia melhorar a resposta contrátil e de relaxamento em artérias de resistência de SHR.

Nossos resultados demonstraram que artérias mesentéricas de resistência de SHR anti-TLR4 apresentaram menor sensibilidade á noradrenalina e ao KCl comparado ao SHR IgG. A ausência de diferença entre os grupos Wistar sugere que a resposta imune inata, representada pelo TLR4, tem uma importante participação

na disfunção vascular associada com a hipertensão. A falta de diferença nas respostas de relaxamento com acetilcolina e nitroprussiato de sódio entre os grupos SHR nos leva então a concluir que o TLR4 contribui com a resposta contrátil do SHR sem alterar o relaxamento.

A constrição anormal da vasculatura a qual esta relacionada com a alta resistência vascular periférica em SHR tem origem, principalmente, de uma maior atividade das células do músculo liso vascular, células endoteliais e/ou de mudanças estruturais na vasculatura (10). Mulvany e colaboradores em 1978 foram os primeiros a demonstrar que a resposta ao KCl e á noradrenalina é maior em artérias de resistência de SHR comparados com Wistar-Kyoto. Na época, os autores justificaram essa diferença descrevendo que as artérias do SHR possuíam um menor lúmen, uma maior espessura da camada média e que existia alguma diferença nas propriedades intracelulares das células do músculo liso entre os grupos (95).

A noradrenalina atua nos vasos, principalmente através dos receptores α adrenérgicos, sendo que esse agonista pode ativar diferentes vias de sinalização, estimulando desta forma a liberação de fatores contráteis como os prostanoídes vasoconstritores, a angiotensina II e espécies reativas de oxigênio (7). Já o KCl atua independentemente de receptor, aumentando a concentração de K^+ extracelular, o que resulta na redução do efluxo de K^+ da célula muscular lisa pelos canais para K^+ da membrana celular e, assim, isso torna o meio intracelular menos negativo e despolariza-o. A despolarização leva à abertura de canais para Ca^{2+} sensíveis à voltagem, presentes na membrana da célula muscular lisa, promovendo o influxo de Ca^{2+} e consequentemente a contração.

O papel dos produtos gerados e das vias de sinalização ativadas pelo TLR4 na disfunção vascular dos SHR pode ser sugerido em nosso estudo uma vez que a incubação tanto com os inibidores da COX-1 e COX-2 quanto do NF- κ B foram capazes de corrigir o aumento da resposta à noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência de SHR IgG. No entanto, em SHR tratados com anti-TLR4 não houve modificação desta resposta. Isso sugere que o tratamento com anti-TLR4 o qual esta diminuindo a ativação deste receptor e consequentemente seus produtos,

contribuem para a diminuição da resposta contrátil nestes vasos por mecanismos dependentes das enzimas COX e do fator nuclear- κ B.

Um dos produtos da sinalização do TLR4 é a COX-2. Já foi demonstrado por Kuper e colaboradores que o LPS aumenta a expressão de COX-2 em células do ducto coletor renal medular através da ativação do TLR4 e NF- κ B (60). As ciclo-oxigenases são enzimas que catalisam a conversão do ácido araquidônico e oxigênio em intermediários endoperóxidos prostaglandina PGG₂ e PGH₂, e estes por sua vez são substratos para a síntese de prostaglandinas e tromboxano. A prostaciclina (PGI₂) age, principalmente, como vasodilatador, porém trabalhos recentes mostram que este prostanóide pode contrair o vaso, dependendo do receptor em que atua (96). O TXA₂ é um potente vasoconstrictor e já foi descrito que este é o principal prostanóide que contribui para a contração vascular na hipertensão arterial (97).

Vários estudos já demonstraram que a resposta vasoconstritora a agonistas adrenérgicos é amplamente mediada pelos prostanóides vasoconstritores derivados da COX (98, 99). Foi demonstrado que a ativação do TLR4 por LPS e Ang II induz a liberação de prostanóides em cultura de macrófagos e de células do músculo liso vascular (47, 100). Neste estudo demonstramos que a expressão protéica de Cox-2 está diminuída em artérias mesentéricas de resistência de SHR anti-TLR4 comparado com SHR IgG, e nenhuma diferença foi encontrada na expressão de COX-1 entre os grupos. Diante da falta de diferença na expressão da COX-1, uma justificativa seria que a atividade dessa enzima esteja reduzida após o tratamento com anti-TLR4 em SHR, sem alterar sua expressão. Alterações na atividade enzimática podem ocorrer através das modificações pós-translacionais ou por alterações na meia vida da proteína o que é característico de algumas enzimas. Esta hipótese de menor atividade das enzimas estudadas é sustentada pelos resultados obtidos nos experimentos funcionais usando o inibidor da COX-1 e COX-2 nas curvas concentração efeito para noradrenalina. Além disso, outro fato é o de que a liberação de tromboxano pela artéria mesentérica após estímulo com noradrenalina foi menor em SHR anti-TLR4 do que em SHR IgG. Dessa forma, estes resultados

sugerem que o TLR4, possui uma importante participação na disfunção vascular associada á hipertensão por um mecanismo dependente de Cox.

Outro fator que fomos estudar foi a participação do NO na reatividade vascular dos SHR após o tratamento com anti-TLR4. O NO é um dos principais fatores relaxantes derivados do endotélio. Este componente colabora com a regulação do tônus vascular e é formado a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina através da ação da enzima NOS (11). Existem três isoformas da NOS, no entanto a principal responsável pela produção de NO no vaso é a eNOS, que é constitutiva. A NOS forma o NO usando diversos co-fatores como, NADPH, FMN, FAD, calmodulina heme e tetrahidrobiopterina (BH4). A eNOS produz NO constantemente para manter o tônus vascular e pode também ser estimulada por agonistas. Uma vez produzido, o NO é liberado pelo endotélio e difunde-se para as células do músculo liso vascular, ativando a guanilato ciclase solúvel, provocando diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular e consequente vasodilatação (101).

Em certas condições, a NOS pode perder sua capacidade de formar NO por remover um elétron da NADPH e doá-lo para moléculas de oxigênio formando superóxido ao invés de NO (102). A produção de superóxido a partir da “eNOS desacoplada”, como é chamada quando isso ocorre, é acompanhada de estresse oxidativo o qual diminui a biodisponibilidade do NO. As causas do desacoplamento da eNOS ainda não é totalmente entendida, mas tem sido sugerido que ocorra devido a oxidação do BH4, mudanças na fosforilação da eNOS ou por mudanças nos dímeros funcionais (103). Na hipertensão, já foi demonstrado que há desacoplamento da eNOS e que isso colabora com o aumento da geração de EROs em SHR, diminuindo a biodisponibilidade do NO e colaborando dessa forma com a disfunção endotelial presente neste modelo (104).

Ao estudar a participação do NO na reatividade em artérias mesentéricas de resistência dos grupos analisados neste trabalho, primeiramente observamos que a expressão da eNOS está diminuída em SHR IgG comparado com Wistar IgG e que o tratamento com anti-TLR4 em SHR aumentou a expressão desta enzima. No estudo funcional, vimos que nos grupos Wistar, ao incubarmos as artérias de resistência com L-NAME (inibidor da NOS) ocorre um aumento da resposta máxima

à noradrenalina, mostrando que o óxido nítrico (NO) é um importante regulador da resposta contrátil á este agonista. No entanto, nos ratos SHR IgG ocorreu o inverso, e esta resposta diminuiu, indicando que neste caso, a modulação do NO esta ausente. Nos SHR tratados com anti-TLR4 não vimos diferença na resposta á noradrenalina com ou sem bloqueio com L-NAME, mostrando que a ação do anti-TLR4 melhorou a disponibilidade de NO, mas não restaurou a resposta. O mecanismo que pode estar envolvido com a menor produção de NO em SHR IgG é devido a geração de especies reativas de oxigênio pela eNOS desacoplada. O bloqueio do anti-TLR4 pode estar melhorando a função da eNOS, mas não normalizando-a, uma vez que o tratamento aumentou a expressão desta enzima, mas não restaurou por completo a resposta funcional.

De fato, neste contexto, de forma interessante vimos, através da técnica de diidroetidina, que a geração de EROs não está alterada entre os grupos estudados, no entanto o estímulo das artérias mesentéricas com noradrenalina aumentou a geração de EROs apenas em ratos SHR IgG, evidenciando que o tratamento com anti-TLR4 foi eficaz em inibir a formação de EROs nestas artérias em ratos SHR, e que este pode ser um dos fatores responsáveis pela menor biodisponibilidade do NO em SHR.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, demonstramos no presente estudo que o TLR4 está superativado em artérias mesentéricas de resistência de SHR e que o bloqueio deste receptor através do tratamento com anti-TLR4 diminui esta ativação reduzindo a expressão e liberação de moléculas pró-inflamatórias, como a IL-6 e Cox-2 que colaboram com o aumento da pressão arterial e com a disfunção vascular presente nos SHR. Em relação a via de sinalização ativada pelo TLR4 na hipertensão, mostramos que envolve a ativação da MyD88, P38 e NF- κ B. Vimos ainda que a neutralização do TLR4 foi capaz de diminuir a PA e reduzir a resposta contrátil nesses vasos por mecanismos envolvendo, principalmente, NF- κ B, Cox e a maior liberação de TXA₂. A contribuição do fator relaxante NO na modulação da resposta contrátil à noradrenalina esta comprometida em SHR e o uso do anti-TLR4 melhora mas não normaliza esta resposta. A geração de EROs após estímulo com NA também foi inibida após o tratamento com anti-TLR4. Desta forma, descrevemos pela primeira vez a importante participação da resposta imune inata, representada pelo TLR4, na fisiopatologia da hipertensão arterial.

Figura 20 - Esquema representativo da conclusão do trabalho, mostrando a sinalização do TLR4 em células da artéria mesentérica de resistência de SHR. As setas vermelhas indicam diminuição do fator representado após o tratamento com anti-TLR4.

MyD88 = proteína adaptadora “myeloid differentiation primary response gene (88)”; p38 = MAPkinases; NFkB = fator de transcrição nuclear κB; IL-6 = interleucina 6; EROs = espécies reativas de oxigênio; COX-2 = ciclo-oxigenase 2; TXA₂ = tromboxano A₂.

Fonte: Bomfim (2012)

REFERÊNCIAS*

1. Whitworth JA. World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens.* 2003;21(11):1983-92.
2. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005;365(9455):217-23.
3. Castro I, Nobre F, Mion Junior D, Gomes MA, Malachias MV, Amodeo C, et al. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(3 Suppl 3):1-24.
4. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation.* 2001;104(23):2855-64.
5. Lawes CM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet.* 2008;371(9623):1513-8.
6. Coffman TM. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat Med.* 2011;17(11):1402-9.
7. Nigro D, Fortes ZB, Scivotetto R, Carvalho MH. Simultaneous release of endothelium-derived relaxing and contracting factors induced by noradrenaline in normotensive rats. *Gen Pharmacol.* 1990;21(4):443-6.
8. Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension.* 1990;16(1):89-101.
9. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension.* 1993;21(4):391-7.
10. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19-26.
11. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-18.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

12. Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D. The role of endothelium in vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res.* 1989;22(5):533-45.
13. Bohr DF. Reactivity of vascular smooth muscle from normal and hypertensive rats: effect of several cations. *Fed Proc.* 1974;33(2):127-32.
14. Bohr DF, Webb RC. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. *Am J Med.* 1984;77(4A):3-16.
15. Berecek KH, Rascher W, Gross F. Vascular reactivity in the pathogenesis of spontaneous hypertension. *Clin Sci (Lond).* 1979;57 Suppl 5:51s-3s.
16. Schiffrin EL. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38 Suppl 2:S3-6.
17. Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension.* 1986;8(3):181-3.
18. Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Cordellini S. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. *J Hypertens.* 1987;5(3):377-82.
19. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3):H985-1002.
20. Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: A therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 2012.
21. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004;44(3):248-52.
22. Watson T, Goon PK, Lip GY. Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(6):1079-88.
23. Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992;70(3):593-9.
24. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S170-80.
25. Li JM, Shah AM. Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II. Role of the p47phox subunit. *J Biol Chem.* 2003;278(14):12094-100.

26. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(2):R277-97.
27. Jastrzebski M, Czarnecka D, Rajzer M, Kawecka-Jaszcz K. Increased levels of inflammatory markers in hypertensives with target organ damage. *Kardiol Pol*. 2006;64(8):802-9; discussion 10-1.
28. Granger JP. An emerging role for inflammatory cytokines in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(3):H923-4.
29. Mahmud A, Feely J. Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. *Hypertension*. 2005;46(5):1118-22.
30. Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(3):H1016-21.
31. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;78(6):539-52. PMID: 2730638.
32. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95(9):858-66.
33. Ferrari R. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res*. 1999;40(2):97-105.
34. Venegas-Pont M, Manigrasso MB, Grifoni SC, LaMarca BB, Maric C, Racusen LC, et al. Tumor necrosis factor- α antagonist etanercept decreases blood pressure and protects the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2010;56(4):643-9. PMID: 2989495.
35. Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem*. 2009;330(1-2):219-28.
36. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2005;19(2):149-54.
37. Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):850-3.
38. Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(2):152-8.

39. Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediel E, de Las Heras N, Vegazo O, Jimenez J, et al. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(1):H111-5.
40. Bautista LE, Lopez-Jaramillo P, Vera LM, Casas JP, Otero AP, Guaracao AI. Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? *J Hypertens*. 2001;19(5):857-61.
41. Li L, Yi-Ming W, Li ZZ, Zhao L, Yu YS, Li DJ, et al. Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res*. 2008;58(3-4):196-201.
42. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA*. 2003;290(22):2945-51.
43. Ofosu-Appiah W, Sfeir G, Smith D, Richard T. Neutrophil-mediated damage to vascular endothelium in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;83(3):293-301.
44. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002;296(5566):301-5.
45. Matzinger P. An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;961:341-2.
46. Bomfim GF, DosSantos RA, Giachini FR, Tostes RC, Fortes ZB, Webb C, et al. Innate Immune Response and Hypertension: Toll Like Receptor 4 Blockade Decrease Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats via Nfkb Inactivation. *Hypertension*. 2011;58(5):E49-E.
47. Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem*. 2009;23(4-6):265-76.
48. Liu N, Liu J, Ji Y, Lu P, Wang C, Guo F. C-reactive protein induces TNF-alpha secretion by p38 MAPK-TLR4 signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Inflammation*. 2011;34(4):283-90.
49. Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol*. 2002;23(3):130-5.
50. Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(2):203-7. PMID: 2843787.

51. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204(10):2449-60. PMCID: 2118469.
52. Crowley SD, Song YS, Lin EE, Griffiths R, Kim HS, Ruiz P. Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(4):R1089-97.
53. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*. 2010;55(2):500-7. PMCID: 2819301.
54. Lohr J, Knoechel B, Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev*. 2006;212:149-62.
55. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, et al. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*. 2011;57(3):469-76.
56. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):169-76.
57. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430(6996):257-63.
58. Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2011;29(1):1-14.
59. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*. 2011;472(7344):476-80.
60. Kuper C, Beck FX, Neuhofer W. Toll-like receptor 4 activates NF-kappaB and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(1):F38-46.
61. Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*. 2010;21 páginas. PMCID: 2913853.
62. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4(8):444-54.
63. Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. Role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Circ Res*. 2004;95(12):e96-7.

64. Pasterkamp G, Van Keulen JK, De Kleijn DP. Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur J Clin Invest.* 2004;34(5):328-34.
65. Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;346(3):739-45.
66. Kim F, Pham M, Luttrell I, Bannerman DD, Tupper J, Thaler J, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res.* 2007;100(11):1589-96.
67. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 1999;104(3):271-80. PMCID: 408420.
68. Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, Takayama H, Spring DJ, Rothnie CL, et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;128(2):170-9.
69. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004;109(6):784-9.
70. Yang X, Coriolan D, Murthy V, Schultz K, Golenbock DT, Beasley D. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(3):H1069-76.
71. Heo SK, Yun HJ, Noh EK, Park WH, Park SD. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunol Lett.* 2008;120(1-2):57-64.
72. Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, Gao X, Kelley J, et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res.* 2005;68(2):224-34.
73. Sales ML, Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Fernandes MN, Piveta C, Cipolli JA, et al. The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. *Clin Chim Acta.* 2010;411(9-10):744-8.
74. Eissler R, Schmaderer C, Rusai K, Kuhne L, Sollinger D, Lahmer T, et al. Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity. *Hypertens Res.* 2011;34(5):551-8.

75. Ahn KO, Lim SW, Li C, Yang HJ, Ghee JY, Kim JY, et al. Influence of angiotensin II on expression of toll-like receptor 2 and maturation of dendritic cells in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*. 2007;83(7):938-47.
76. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009;29(2):359-70.
77. Kim YO, Lim SW, Li C, Kang HJ, Ahn KO, Yang HJ, et al. Activation of intrarenal complement system in mouse model for chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Yonsei Med J*. 2007;48(3):517-25. PMID: 2628083.
78. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
79. Liew FY, Liu H, Xu D. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. *Immunol Lett*. 2005;96(1):27-31.
80. Yang J, Jiang H, Ding JW, Chen LH, Li S, Zhang XD. Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biochem*. 2009;330(1-2):39-46.
81. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(5):301-16.
82. Daubeuf B, Mathison J, Spiller S, Hugues S, Herren S, Ferlin W, et al. TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock. *J Immunol*. 2007;179(9):6107-14.
83. Fort MM, Mozaffarian A, Stover AG, Correia Jda S, Johnson DA, Crane RT, et al. A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol*. 2005;174(10):6416-23.
84. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
85. Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*. 2003;52(1):144-51. PMID: 1773518.
86. Jin J, Samuvel DJ, Zhang X, Li Y, Lu Z, Lopes-Virella MF, et al. Coactivation of TLR4 and TLR2/6 coordinates an additive augmentation on IL-6 gene transcription via p38MAPK pathway in U937 mononuclear cells. *Mol Immunol*. 2011;49(3):423-32. PMID: 3224151.

87. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, Schmid JA. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(11):E83-8.
88. Purkayastha S, Zhang G, Cai D. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med.* 2011;17(7):883-7. PMCID: 3134198.
89. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Mezzano S, Vaziri ND. Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(1):51-7.
90. Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vazquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-kB. *J Inflamm (Lond).* 2010;7:21. PMCID: 2879251.
91. Gornikiewicz A, Sautner T, Brostjan C, Schmierer B, Fugger R, Roth E, et al. Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J.* 2000;14(9):1093-100.
92. Han Y, Runge MS, Brasier AR. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res.* 1999;84(6):695-703.
93. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J.* 2000;21(19):1574-83.
94. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, Osborne JB, Jr., Fleming C, Pollock JS, et al. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(3):H935-40.
95. Mulvany MJ, Hansen OK, Aalkjaer C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. *Circ Res.* 1978;43(6):854-64.
96. Gluais P, Lonchampt M, Morrow JD, Vanhoutte PM, Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2005;146(6):834-45. PMCID: 1751221.
97. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension.* 1990;15(6 Pt 2):699-703.

98. Tabernero A, Giraldo J, Vila E. Modelling the changes due to the endothelium and hypertension in the alpha-adrenoreceptor-mediated responses of rat aorta. *J Auton Pharmacol.* 1999;19(4):219-28.
99. Alvarez Y, Briones AM, Balfagon G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens.* 2005;23(4):767-77.
100. Park DW, Baek K, Lee JG, Park YK, Kim JH, Kim JR, et al. Activation of toll-like receptor 4 modulates vascular endothelial growth factor synthesis through prostacyclin-IP signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;362(4):1090-5.
101. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006;147 Suppl 1:S193-201. PMCID: 1760731.
102. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem.* 1998;273(40):25804-8.
103. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9220-5. PMCID: 21319.
104. Li H, Witte K, August M, Brausch I, Godtel-Armbrust U, Habermeier A, et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(12):2536-44.

APÊNDICES – Artigos de periódicos

- APÊNDICE A** - Bomfim, GF, DosSantos RA, Oliveira, MA, Giachini, FR, Tostes RCA, Fortes ZB, Webb RC, Carvalho MHC. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science*, 2012; 122 (11): 535-43.

Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats

Gisele F. BOMFIM[†], Rosângela A. DOS SANTOS[‡], Maria Aparecida OLIVEIRA[‡],
Fernanda R. GIACHINI[†], Eliana H. AKAMINE[‡], Rita C. TOSTES[‡],
Zuleica B. FORTES[‡], R. Clinton WEBB[†] and Maria Helena C. CARVALHO[‡]

^{*}Department of Pharmacology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, [†]Department of Physiology, Georgia Health Sciences University, Augusta, GA, U.S.A., and [‡]Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ABSTRACT

Activation of TLRs (Toll-like receptors) induces gene expression of proteins involved in the immune system response. TLR4 has been implicated in the development and progression of CVDs (cardiovascular diseases). Innate and adaptive immunity contribute to hypertension-associated end-organ damage, although the mechanism by which this occurs remains unclear. In the present study, we hypothesize that inhibition of TLR4 decreases BP (blood pressure) and improves vascular contractility in resistance arteries from SHR (spontaneously hypertensive rats). TLR4 protein expression in mesenteric resistance arteries was higher in 15-week-old SHR than in age-matched Wistar controls or in 5-week-old SHR. To decrease the activation of TLR4, 15-week-old SHR and Wistar rats were treated with anti-TLR4 (anti-TLR4 antibody) or non-specific IgG control antibody for 15 days (1 µg per day, intraperitoneal). Treatment with anti-TLR4 decreased MAP (mean arterial pressure) as well as TLR4 protein expression in mesenteric resistance arteries and IL-6 (interleukin 6) serum levels from SHR when compared with SHR treated with IgG. No changes in these parameters were found in treated Wistar control rats. Mesenteric resistance arteries from anti-TLR4-treated SHR exhibited decreased maximal contractile response to NA (noradrenaline) compared with IgG-treated SHR. Inhibition of COX (cyclo-oxygenase)-1 and COX-2, enzymes related to inflammatory pathways, decreased NA responses only in mesenteric resistance arteries of SHR treated with IgG. COX-2 expression and TXA₂ (thromboxane A₂) release were decreased in SHR treated with anti-TLR4 compared with IgG-treated SHR. Our results suggest that TLR4 activation contributes to increased BP, low-grade inflammation and plays a role in the augmented vascular contractility displayed by SHR.

INTRODUCTION

TLR4 (Toll-like receptor 4) is expressed on virtually all human cells and binds a wide spectrum of

exogenous [including bacterial LPS (lipopolysaccharide)] and endogenous [HSP (heat-shock protein) and AngII (angiotensin II)] ligands. TLR4 is involved in innate immune responses to various infectious agents and

Key words cyclo-oxygenase, hypertension, inflammation, mesenteric resistance artery, Toll-like receptor 4 (TLR4).

Abbreviations AngII, angiotensin II; BP, blood pressure; CRP, C-reactive protein; COX, cyclo-oxygenase; CVD, cardiovascular disease; HR, heart rate; HSP, heat-shock protein; 6-keto PGF_{1α}, 6-keto prostaglandin F_{1α}; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; MAP, mean arterial pressure; MAPK, mitogen-activated protein kinase; NA, noradrenaline; NF-κB, nuclear factor κB; NS-398, N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methanesulfonamide; PG, prostaglandin; SC-560, 5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-trifluoromethylpyrazole; SHR, spontaneously hypertensive rats; TLR, Toll-like receptor; TNFα, tumour necrosis factor α; TXA₂, thromboxane A₂; TXB₂, thromboxane B₂; VSMC, vascular smooth muscle cell.

Correspondence: M. Gisele F. Bomfim (email: gifacholi@yahoo.com.br).

stressors [1]. In the presence of a ligand, the TLR4 receptor activates intracellular pathways that culminate in NF- κ B (nuclear factor κ B) phosphorylation, resulting in an inflammatory process characterized mainly by the production of pro-inflammatory cytokines [2].

TLR4 has been implicated in mediating chronic inflammatory diseases, including CVDs (cardiovascular diseases) [3]. TLR4 up-regulation has been observed after myocardial infarction in the heart of mice [4] and it is also related to the initiation and progression of atherosclerosis [5]. TLR4 expression is augmented in cardiomyocytes from SHR (spontaneously hypertensive rats), when compared with Wistar-Kyoto rats, suggesting that this receptor may be implicated in hypertension-associated end-organ damage [6].

The downstream products of TLR signalling are COX (cyclo-oxygenase)-2 and pro-inflammatory cytokines [7]. COX-2 is an inducible isoform of the COX enzyme that catalyses the formation of PGs (prostaglandins), which may mediate inflammatory responses. One important PG produced by COX-1 and COX-2 is TXA₂ (thromboxane A₂), which is a potent vasoconstrictor that contributes to increased vascular contraction in arterial hypertension [8].

Arterial hypertension is a well-known risk factor for various CVDs and, currently, it is estimated that 25% of the adult population is affected by this disease [9]. It has been suggested that both innate and adaptive immunity contribute to the pathophysiology of hypertension [10]. In this regard, Guzik et al. [11] observed that mice lacking lymphocytes are resistant to the development of hypertension. Adoptive transfer of T-cells restored hypertensive responses to AngII and DOCA (deoxycorticosterone)-salt challenge in these mice [11], showing the importance of adaptive immune response in hypertension.

Considering the concept that inflammation is closely linked to hypertension and that the role of innate immune system, represented by TLR4 activation, in hypertension is still unclear, we hypothesized that TLR4 is up-regulated in resistance arteries of SHR and its increased activation contributes to both increased vascular response to contractile stimuli and augmented BP (blood pressure) levels in SHR.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (15 weeks old) and SHR (5 and 15 weeks old; Harlan Laboratories) were used in the present study. All procedures were performed in accordance with the Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the Medical College of Georgia Committee on the Use of Animals in Research and Education and in accordance with the Guide for the Care and Use

of Laboratory Animals published by the U.S. National Institutes of Health. The animals were housed under a 12 h light/12 h dark cycle and fed on a standard chow diet with water *ad libitum*.

Treatment with the anti-TLR4 (anti-TLR4 antibody)

TLR4 inhibition was performed by treating 15-week-old SHR and Wistar rats with a daily intraperitoneal injection of 1 μ g of anti-TLR4 (rat monoclonal IgG_{2a}, saline-diluted; sc-13591, Santa Cruz Biotechnology) for 15 days [12]. Control SHR and Wistar rats were treated in the same way with 1 μ g of a non-specific IgG antibody (IgG_{2a}, saline-diluted; sc-2026, Santa Cruz Biotechnology) to rule out non-specific effects of TLR4 antibody treatment. In the text, the control groups are identified as IgG or non-specific IgG.

Arterial BP measurement

Rats were anaesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (64.9 and 3.2 mg/kg of body weight respectively, intraperitoneal injections). The right carotid artery was cannulated with a heparinized polyethylene catheter (PE-50) that was exteriorized in the mid-scapular region. After 24 h, arterial pressure and HR (heart rate) were measured in conscious animals by a pressure transducer (model DT-100; Utah Medical Products) and recorded using an interface and software for computer data acquisition (Quad Bridge Amp/PowerLab 4/30; ADInstruments). HR was determined from the interbeat intervals.

Western blotting

Extracted proteins (50 μ g) from small mesenteric arteries were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and transferred on to a nitrocellulose membrane. Non-specific binding sites were blocked with 5% (w/v) non-fat dried skimmed milk powder in Tris-buffered saline (10 mmol/l Tris/HCl, pH 7.4, 100 mmol/l NaCl and 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies were: anti-TLR4 (1:250 dilution), anti-COX-1 (1:500 dilution) and anti-COX-2 (1:500 dilution) (all antibodies from Cell Signaling Technology). Membranes were washed with Tris-buffered saline and incubated for 1 h at room temperature with the secondary anti-rabbit antibody (1:1500 dilution). After incubation, membranes were washed with Tris-buffered saline and the signals were revealed by chemiluminescence, visualized by autoradiography film and quantified by densitometry. The same membrane was used to determine β -actin protein expression using a monoclonal antibody against β -actin (1:15000 dilution; Sigma-Aldrich), and its content was used to normalize protein expression in each sample. All representative Western blot images shown in Figures 1 and 5 were obtained from the same membrane.

Vascular function studies

After killing with isoflurane (via nasal 5% in 100% O₂), second-order mesenteric resistance arteries (200–300 μ m internal diameter) were removed and cleaned from fat tissue in Krebs solution (130 mmol/l NaCl, 14.9 mmol/l NaHCO₃, 4.7 mmol/l KCl, 1.18 mmol/l KH₂PO₄, 1.17 mmol/l MgSO₄·7H₂O, 1.56 mmol/l CaCl₂·2H₂O, 0.026 mmol/l EDTA and 5.5 mmol/l glucose). Arterial segments (2 mm in length) were mounted on 40 μ m wires in a small vessel myograph for isometric tension recording and equilibrated in Krebs solution for approximately 30 min, gassed with 5% CO₂ in O₂ to maintain a pH of 7.4. The relationship between resting wall tension and internal circumference was determined, and the internal circumference, L100, corresponding to a transmural pressure of 100 mmHg for a relaxed vessel *in situ*, was calculated. The vessels were set to the internal circumference L1, given by $L1 = 0.9 \times L100$. After stabilization, arterial integrity was assessed by stimulation of vessels, two times with 120 mmol/l KCl. Endothelial integrity was assessed by testing the relaxant effect of acetylcholine (1 μ mol/l; Sigma-Aldrich) on vessels pre-contracted with 3 μ mol/l NA (noradrenaline; Sigma-Aldrich).

Cumulative concentration–response curves to NA (10–100 μ mol/l) were performed in arteries with endothelium. Curves were performed in the presence and absence of either a COX-1 inhibitor {SC-560 [5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-trifluoromethylpyrazole]; 9 nmol/l} or COX-2 inhibitor {NS-398 [N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)methanesulfonamide]; 10 μ mol/l}, which were added to the preparation 30 min before starting the concentration–response curves to NA. Both inhibitors used are from Cayman Chemical.

Release of TXB₂ (thromboxane B₂) and 6-keto PGF_{1 α}

Mesenteric arteries were cut into transverse rings 4 mm in length, to measure the release of prostanoids. These were placed for 30 min in siliconized tubes containing 0.5 ml of Krebs solution at 37°C, and stimulated with 100 mM NA for 15 min. The PGs were measured with a commercially available EIA kit (Cayman Chemical). Twice-diluted 50 μ l samples were used for measurement of TXB₂ (a stable metabolite of TXA₂) and 6-keto PGF_{1 α} (stable metabolite of PGI₂). The assays were performed according to the manufacturer's instructions. The amounts of PGs released are expressed as pg or ng/mg of wet mass of mesenteric artery.

Cytokine measurement

Serum levels of IL-6 (interleukin-6) and TNF α (tumour necrosis factor α) were determined using a quantitative

sandwich EIA/ELISA kits (GE Healthcare) in IgG- and anti-TLR4-treated SHR. IL-6 and TNF α concentrations are expressed as pg/ml.

Data analysis

Results are shown as means $\pm$ S.E.M. and *n* represents the number of animals used in the experiments. Contractile responses are expressed as the maximum response produced by each agonist concentration. Concentration–response curves were fitted using a non-linear interactive fitting program (Graph Pad Prism 4.0) and two pharmacological parameters were analysed: the maximal effect elicited by the agonist (E_{max}) and the sensitivity to this agonist ($-\log EC_{50}$, pD_2). Statistical analyses of E_{max} and pD_2 values were performed using one-way ANOVA (post-hoc Tukey) or Student's *t* test, where appropriate. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

TLR4 expression in mesenteric resistance arteries from SHR and Wistar rats

TLR4 protein expression was significantly increased in mesenteric arteries from 15-week-old SHR (hypertensive phase) compared with same age Wistar or 5-week-old SHR (pre-hypertensive phase) (Figure 1A and 1B respectively). Treatment of 15-week-old SHR and Wistar with anti-TLR4 antibody decreased TLR4 expression in mesenteric resistance arteries from SHR, but not in Wistar rats (Figure 1C). These results demonstrate that TLR4 expression is increased in SHR and that the anti-TLR4 treatment was effective in reducing its expression.

Effect of anti-TLR4 treatment on haemodynamic parameters and body mass

Anti-TLR4 treatment lowered MAP (mean arterial pressure) in SHR, compared with SHR treated with non-specific IgG (Figure 2A). However, no change in MAP was observed in Wistar rats after anti-TLR4 treatment. HR (Figure 2B) was similar between all the groups. Body mass did not change among the groups (510 $\pm$ 15 and 502 $\pm$ 30 g in the IgG and anti-TLR4 Wistar groups respectively; 334 $\pm$ 8 and 327 $\pm$ 13 g in the IgG and anti-TLR4 SHR groups respectively). These results suggest that increased activation of TLR4 contributes to augmented BP observed in SHR.

Effect of anti-TLR4 treatment on vascular contractility

The E_{max} and pD_2 to NA were significantly decreased in endothelium-intact mesenteric resistance arteries from anti-TLR4-treated SHR when compared with those in

Figure 1 TLR4 protein expression is augmented in mesenteric resistance arteries from 15-week-old SHR compared with age-matched Wistar rats or 5-week-old SHR

Anti-TLR4 treatment decreased TLR4 protein expression in SHR. (A) TLR4 protein expression was analysed in mesenteric resistance arteries from 15-week-old Wistar rats (white bar) and SHR (black bar), and (B) in 5-week-old (white bar) and 15-week-old (black bar) SHR. (C) We also evaluated TLR4 protein expression in Wistar rats and SHR treated with IgG or anti-TLR4. Above the histograms are representative Western blot images of TLR4 and β-actin protein expression. Histograms show the relative expression of TLR4 after normalization to β-actin expression. Values are means $\pm$ S.E.M., $n = 6$. * $P < 0.05$ compared with Wistar rats (A), 5-week-old SHR (B) and Wistar rats IgG (C); # $P < 0.05$ compared with SHR IgG (C). Statistical tests, Student's t test (A and B) and one-way ANOVA (C).

Figure 2 Anti-TLR4 treatment decreased the BP of SHR

(A) MAP (mmHg) and (B) HR [beats/min (BPM)] were evaluated in Wistar rats and SHR treated with IgG (white bars) or anti-TLR4 (black bars). Results are expressed as means $\pm$ S.E.M., $n = 6$. * $P < 0.05$ compared with Wistar IgG and † $P < 0.05$ compared with SHR IgG, using a one-way ANOVA.

arteries from unspecific IgG-treated SHR (Figures 3A and 3C and Table 1). No differences were observed between arteries from the Wistar groups (Figure 3B).

Pre-incubation of mesenteric resistance arteries with either SC-560 (COX-1 inhibitor) or NS-398 (COX-2 inhibitor) decreased the E_{max} (maximal response) and pD_2

($-\log EC_{50}$) to NA in arteries from IgG-treated SHR, but not in arteries from anti-TLR4-treated SHR and Wistar groups (Figures 4A and 4B and Table 1).

Together, these findings demonstrate that anti-TLR4 treatment decreases the augmented contractile response observed in SHR. In addition, COX-1 and COX-2

Table 1 $E_{\max}$ (maximal response) and sensitivity (pD_2) to KCl and NA with or without inhibitors in mesenteric resistance arteries from Wistar and SHR treated with IgG or anti-TLR4
Values are means $\pm$ S.E.M., $n = 6-12$. * $P < 0.05$ compared with SHR + IgG (NA); # $P < 0.05$ compared with Wistar + IgG (NA) using a one-way ANOVA. NS-398, COX-2 inhibitor; SC-560, COX-1 inhibitor.

Treatment	Wistar + IgG		Wistar + anti-TLR4		SHR + IgG		SHR + anti-TLR4	
	$E_{\max}$	pD_2	$E_{\max}$	pD_2	$E_{\max}$	pD_2	$E_{\max}$	pD_2
NA	19.9 $\pm$ 1.4	6.3 $\pm$ 0.06	17.1 $\pm$ 1.9	6.1 $\pm$ 0.08	27.8 $\pm$ 1.6#	6.1 $\pm$ 0.04	19.0 $\pm$ 1.7*	5.8 $\pm$ 0.08*
NA + NS-398	14.2 $\pm$ 1.9	6.0 $\pm$ 0.07	14.9 $\pm$ 1.7	5.9 $\pm$ 0.06	17.1 $\pm$ 1.3*	5.2 $\pm$ 0.05*	15.8 $\pm$ 1.1	5.5 $\pm$ 0.06
NA + SC-560	21.3 $\pm$ 3.7	6.1 $\pm$ 0.08	19.5 $\pm$ 1.9	6.3 $\pm$ 0.07	15.9 $\pm$ 1.1*	5.3 $\pm$ 0.04*	18.9 $\pm$ 1.5	5.5 $\pm$ 0.03

Figure 3 NA-induced vasoconstriction in mesenteric resistance arteries from SHR is attenuated by anti-TLR4 treatment
Maximal response to (A) NA in mesenteric resistance arteries from Wistar rats and SHR treated with IgG (white bars) or anti-TLR4 (black bars). Cumulative concentration-response curves to NA in endothelium-intact mesenteric resistance arteries from (B) Wistar treated with IgG (open circle) or anti-TLR4 (closed circle) and (C) SHR treated with IgG (open square) or anti-TLR4 (closed square). Each point represents the means $\pm$ S.E.M. of maximal response to each concentration, $n = 10-12$. * $P < 0.05$ compared with Wistar IgG, and # $P < 0.05$ compared with SHR IgG, using a one-way ANOVA.

are involved in signalling pathways that contribute to decreased NA contraction response in mesenteric resistance arteries from anti-TLR4-treated SHR.

Effect of anti-TLR4 treatment on COX expression, pro-inflammatory cytokines and prostanoids release

We evaluated whether TLR4 modulates, in SHR, the expression of COX-1 and COX-2, as well as the release of the prostanoids TXA₂ and prostacyclin by mesenteric arteries and the levels of the cytokines IL-6 and TNF α , in the serum.

COX-1 protein expression in small mesenteric arteries did not change after anti-TLR4 treatment when compared

with IgG groups (Figure 5A). However, COX-2 protein expression was decreased in mesenteric arteries from SHR treated with anti-TLR4 compared with IgG-treated SHR (Figure 5B).

The TXB₂ released by segments of mesenteric arteries stimulated with NA (100 mM) is increased in SHR IgG when compared with all other groups, and the anti-TLR4 treatment decreased the production of this vasoconstrictor prostanoids in SHR (Figure 5C). No difference was found in 6-keto PGF_{1 α} secretion between the groups (Figure 5D).

Serum levels of IL-6 and TNF α were measured in IgG-treated and anti-TLR4-treated SHR. IL-6, but not TNF α , was decreased after treatment with anti-TLR4 in SHR (IL-6, 478 $\pm$ 44.5 and 337 $\pm$ 24 pg/ml in the IgG and

Figure 4 COX-1 and COX-2 inhibition decreased the maximal response to NA only in IgG-treated SHR mesenteric arteries

E_{max} to NA in the absence (white bars) or presence of (A) SC-560 (COX-1 inhibitor) or (B) NS-398 (COX-2 inhibitor) (black bars) in mesenteric resistance arteries from Wistar rats and SHR treated with IgG or anti-TLR4. * $P < 0.05$ compared with SHR IgG NA, using a one-way ANOVA.

anti-TLR4 groups respectively, $P < 0.05$, using a Student's t test; TNF α , 112 ± 53 and 98 ± 9.5 pg/ml in the IgG and anti-TLR4 groups respectively; values are means $\pm$ S.E.M., $n = 9$).

These results demonstrate that TLR4 inhibition attenuated the activation of inflammatory markers, as demonstrated by decreased COX-2 expression, lower IL-6 serum levels and thromboxane release in mesenteric arteries from SHR.

DISCUSSION

The major findings of the present study are that the treatment of adult SHR with anti-TLR4 antibody reduces MAP as well as decreasing contractile responses in mesenteric resistance arteries when compared with non-specific IgG-treated SHR.

Essential hypertension is characterized by increased peripheral vascular resistance, which is mainly determined by small resistance arteries and arterioles. At the functional level, both an increase in the contractile responses or a decrease in relaxant responses in resistance arteries might increase peripheral resistance. Inflammation of the vascular wall is associated with

the dysfunction of blood vessels [13]. In view of the decreased BP observed after anti-TLR4 treatment in SHR, we investigated whether this treatment could improve contractile responses in resistance arteries from SHR. Our results demonstrate that mesenteric resistance arteries from anti-TLR4-treated SHR showed lower sensitivity to NA compared with IgG-treated SHR. However, no changes were found in Wistar groups. These findings suggest that the innate immune response, represented by TLR4, plays a role in the vascular dysfunction associated with hypertension [13].

Activation of TLR4 results in an increase in its own expression [14]. Therefore the reduction of TLR expression is a possible mechanism by which TLR activation can be controlled [15,16]. Our results demonstrated that anti-TLR4 treatment decreased TLR4 protein expression, which is up-regulated in adult SHR compared with young SHR and compared with Wistar rats. The regulation of TLR4 expression was showed in a model of myocardial ischaemia/reperfusion, in which TLR4 is up-regulated. In those rats, treatment with valsartan, an angiotensin receptor blocker with anti-inflammatory properties, decreased the expression and activation of TLR4 [17].

Anti-TLR4 antibody treatment has been tested in some inflammatory conditions, such as sepsis and chronic bowel disease, with promising results, showing a decrease in the inflammatory process [18,19]. Hypertension is considered as a chronic inflammatory disease, in which elevated pro-inflammatory cytokines and COX-derived prostanooids, mainly from the COX-2 isoform, are observed [20]. We hypothesized that the reduction in TLR4 effects, by using neutralizing antibody *in vivo*, would ameliorate hypertensive low-grade inflammation. Here, we observed that treatment with anti-TLR4 antibody decreased the expression of TLR4, COX-2 and IL-6 serum levels, which are markers of inflammation. Therefore our results suggest that TLR4 is associated with low-grade inflammation in hypertension.

The major downstream molecular mechanism involved in TLR4 activation is a MyD88 (myeloid differentiation factor 88)-dependent pathway that involves IRAK (IL-1-receptor-associated kinase), TRAF-6 (TNF-receptor-associated factor 6) and MAPK (mitogen-activated protein kinase), and that culminates in the activation of NF- κ B [2]. In turn, NF- κ B mediates the transcription of COX-2 and pro-inflammatory cytokine genes. Kuper et al. [21] demonstrated that LPS mediates enhanced COX-2 expression in renal medullary collection duct cells by TLR4-mediated activation of the NF- κ B signalling pathway. In hypertension, as mentioned before, TLR4 expression is increased in the heart of SHR compared with Wistar-Kyoto rats [6]. Conversely, studies such as the one by Li et al. [22] showed that NF- κ B is activated in the heart, kidney and aorta in SHR compared with Wistar-Kyoto rats.

Figure 5 Anti-TLR4 treatment decreases COX-2 protein expression and TXB₂ release in mesenteric arteries

(A) COX-1 and (B) COX-2 proteins expression in mesenteric resistance arteries from IgG- (white bars) or anti-TLR4-treated (black bars) Wistar rats and SHR. Upper panel, representative Western blot images of COX-1 (A) and COX-2 (B) protein expression. The histograms show the relative expression of COX-1 and COX-2 after normalization to β -actin expression. Release of (C) TXB₂ and (D) 6-keto PGF_{1 α} by mesenteric arteries stimulated with 100 μ M NA. Each bar represents the means $\pm$ S.E.M., $n = 5-6$, * $P < 0.05$, using a one-way ANOVA.

Many studies have shown that TLR4 is clearly responsible for inflammation induced by endogenous ligands, such as CRP (C-reactive protein) [23] and HSP60 and HSP70 in smooth muscle cells and many other cell types [24,25]. In hypertension, these molecules are increased [26,27] and could act as long-term TLR4 activators, resulting in augmented expression of several pro-inflammatory cytokines in vascular smooth muscle [28]. Pro-inflammatory cytokines regulate the expression and function of several proteins, including adhesion molecules, MAPKs, extracellular matrix components and growth factors, which are important in vessel hypertrophy and vascular dysfunction described in hypertension [13,29]. Cytokines seem to influence the balance between vasoconstrictor and vasodilator factors, as well as regional differences in the release and responsiveness to these factors, contributing to the increased responsiveness within a specific vascular bed in hypertension [20].

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that is released from numerous cell types, including endothelial cells [30,31], VSMCs (vascular smooth muscle cells) [32] and macrophages [33]. IL-6 stimulates the synthesis of many acute-phase reaction proteins, including CRP, SAA (serum amyloid A) and fibrinogen [34]. IL-6 also promotes VSMC proliferation, a hallmark of

hypertension and atherosclerosis [35]. Some studies have shown a positive association between IL-6 levels and high BP [36-38]. Previous work from Brands and co-workers [39] showed that hypertension caused by a high-salt diet and AngII was blunted in mice lacking a functional gene for IL-6. In our present study, we observed a reduction in IL-6 secretion in SHR by anti-TLR4 treatment, which was accompanied by a decrease in BP, suggesting that IL-6 is a key cytokine in the development of the pathophysiology of hypertension.

Evidence showed that the vasoconstrictor response to adrenergic agonists is largely mediated by COX-derived vasoconstrictor prostanoids [8,40]. Hypertension is thought to modify the role of these products in the vasodilator and vasoconstrictor responses [8,41,42]. Furthermore, it has been reported that activation of TLR4 by LPS and AngII may induce the release of prostanoids in cultured macrophages and smooth muscle cells [28,43]. In the present study, we demonstrated that COX-2 protein expression is decreased in mesenteric resistance arteries from anti-TLR4-treated SHR compared with IgG-treated SHR, and no differences were found in COX-1 expression among groups. Despite the lack of change in the expression of COX-1, one possibility is that its activity may be decreased after anti-TLR4 therapy. This hypothesis is supported by the fact that the

inhibition of COX-1 and COX-2 reduced the contractile response to NA only in mesenteric resistance arteries from IgG-treated SHR, whereas it remained unchanged in resistance arteries from anti-TLR4-treated SHR. In addition, the release of TXA₂ in mesenteric arteries after NA stimulation was reduced in anti-TLR4-treated SHR compared with SHR treated with IgG. Taken together, these results suggest that the innate immune response, represented by TLR4 activation, plays a role in the vascular dysfunction associated with hypertension by a COX-dependent mechanism [13]. Future studies will help clarify the molecular pathways linking these events.

Hypertension is an important worldwide public-health challenge because of its high prevalence and concomitant risks of cardiovascular and kidney disease. A variety of pharmacological preparations are available for therapy; however, despite these options, vascular dysfunction persists in many patients, and end-organ injury remains a serious complication. The cardiovascular system is exposed to pathogens and danger signals (endogenous ligands), resulting in activation of pattern-recognition receptors including TLRs. Considering that hypertension is a low-grade inflammatory disease, the innate immune response, represented mainly by TLR, may be investigated as a mechanism that contributes to the development of this condition.

In conclusion, our present findings demonstrate that increased TLR4 expression may play an important role in arterial hypertension. Moreover, anti-TLR4 treatment decreased BP, pro-inflammatory mediators and vascular contraction in resistance arteries of SHR.

AUTHOR CONTRIBUTION

Experimental work was performed by Gisele Bomfim, Rosângela Dos Santos, Maria Aparecida Oliveira and Fernanda Giachini. Design, analysis and interpretation of the data were performed by Eliana Akamine, Rita Tótes and Zuleica Fortes Clinton Webb and Maria Helena Carvalho, who directed the study.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Ana Rita Gonçalves Araujo, Antonio Garcia Soares Jr, Marta Rodrigues da Silva and Sonia Maria Rodrigues Leite for their excellent technical support, and Theodora Szasz for the correction of the manuscript.

FUNDING

This study was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq), Brazil, and the National Institutes of Health [grant numbers NIH HL071138, DK083695].

REFERENCES

- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, Jr, C. A. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397.
- Kawai, T. and Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**, 816–825.
- Frantz, S., Ertl, G. and Bauersachs, J. (2007) Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4**, 444–454.
- Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y. D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R. T. and Kelly, R. A. (1999) Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J. Clin. Invest.* **104**, 271–280.
- Pasterkamp, G., Van Keulen, J. K. and De Kleijn, D. P. (2004) Role of Toll-like receptor 4 in the initiation and progression of atherosclerotic disease. *Eur. J. Clin. Invest.* **34**, 328–334.
- Eissler, R., Schmaderer, C., Rusai, K., Kuhne, L., Sollinger, D., Lahmer, T., Witzke, O., Lutz, J., Heemann, U. and Baumann, M. (2011) Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity. *Hypertens. Res.* **34**, 551–558.
- El-Achkar, T. M., Plotkin, Z., Marcic, B. and Dagher, P. C. (2007) Sepsis induces an increase in thick ascending limb COX-2 that is TLR4 dependent. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **293**, F1187–F1196.
- Alvarez, Y., Briones, A. M., Balfagon, G., Alonso, M. J. and Salas, M. (2005) Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanooids from cyclo-oxygenase-2 in phenylephrine responses. *J. Hypertens.* **23**, 767–777.
- Keatney, F. M., Whelton, M., Keyouk, K., Muutner, P., Whelton, P. K. and He, J. (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* **365**, 217–223.
- Harrison, D. G., Vinh, A., Lob, H. and Madhur, M. S. (2010) Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 203–207.
- Guzik, T. J., Hoch, N. E., Brown, K. A., McCann, L. A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C. and Harrison, D. G. (2007) Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* **204**, 2449–2460.
- Milanski, M., Degasperis, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E., Tsukumo, D. M., Anhe, G., Amaral, M. E., Takahashi, H. K. et al. (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* **29**, 359–370.
- Bautista, L. E. (2003) Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. *J. Hum. Hypertens.* **17**, 223–230.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376.
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. and O'Neill, L. A. (2005) Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 446–458.
- Chan, A. C. and Carter, P. J. (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 301–316.
- Yang, J., Jiang, H., Ding, J. W., Chen, L. H., Li, S. and Zhang, X. D. (2009) Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **330**, 39–46.
- Dambeuf, B., Mathison, J., Spiller, S., Hugues, S., Herren, S., Ferlin, W., Kosco-Vilbois, M., Wagner, H., Kirschning, C. J., Ulevitch, R. and Elson, G. (2007) TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock. *J. Immunol.* **179**, 6107–6114.

- 19 Fort, M. M., Mozaffarian, A., Stover, A. G., Correia Jda, S., Johnson, D. A., Crane, R. T., Ulevitch, R. J., Persing, D. H., Bielefeldt-Ohmann, H. and Probst, P. (2005) A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J. Immunol.* **174**, 6416–6423
- 20 Vila, E. and Salices, M. (2005) Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H1016–H1021
- 21 Kuper, C., Beck, F. X. and Neuhofer, W. (2012) Toll-like receptor 4 activates NF- κ B and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **302**, F38–F46
- 22 Li, D. J., Evans, R. G., Yang, Z. W., Song, S. W., Wang, P., Ma, X. J., Liu, C., Xi, T., Su, D. F. and Shen, F. M. (2011) Dysfunction of the cholinergic anti-inflammatory pathway mediates organ damage in hypertension. *Hypertension* **57**, 298–307
- 23 Liu, N., Liu, J. T., Ji, Y. Y. and Lu, P. P. (2010) C-reactive protein triggers inflammatory responses partly via TLR4/IRF3/NF- κ B signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* **87**, 367–374
- 24 Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. and Kolb, H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* **164**, 558–561
- 25 Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A. and Calderwood, S. K. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028–15034
- 26 Pockley, A. G., Wu, R., Lemne, C., Kiessling, R., de Faire, U. and Frostegard, J. (2000) Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* **36**, 303–307
- 27 Bautista, L. E. (2005) Association of C-reactive protein with blood pressure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, e137
- 28 Ji, Y., Liu, J., Wang, Z. and Liu, N. (2009) Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **23**, 265–276
- 29 Sprague, A. H. and Khalil, R. A. (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 539–552
- 30 McCarty, M. F. (1999) Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. *Med. Hypotheses* **52**, 465–477
- 31 Gornikiewicz, A., Sautner, T., Brostjan, C., Schmieder, B., Fugger, R., Roth, E., Muhlbacher, F. and Bergmann, M. (2000) Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J.* **14**, 1093–1100
- 32 Han, Y., Runge, M. S. and Brasier, A. R. (1999) Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors. *Circ. Res.* **84**, 695–703
- 33 Turnbull, A. V. and Rivier, C. L. (1999) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* **79**, 1–71
- 34 Woods, A., Brull, D. J., Humphries, S. E. and Montgomery, H. E. (2000) Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur. Heart J.* **21**, 1574–1583
- 35 Ikeda, U., Ikeda, M., Oohara, T., Oguchi, A., Kamitani, T., Tsuruya, Y. and Kano, S. (1991) Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **260**, H1713–H1717
- 36 Bautista, L. E., Vera, L. M., Arenas, I. A. and Gamarra, G. (2005) Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **19**, 149–154
- 37 Alexander, B. T., Cockrell, K. L., Massey, M. B., Bennett, W. A. and Granger, J. P. (2002) Tumor necrosis factor- α -induced hypertension in pregnant rats results in decreased renal neuronal nitric oxide synthase expression. *Am. J. Hypertens.* **15**, 170–175
- 38 Granger, J. P. (2006) An emerging role for inflammatory cytokines in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H923–H924
- 39 Lee, D. L., Sturgis, L. C., Labazi, H., Osborne, Jr, J. B., Fleming, C., Pollock, J. S., Manhiani, M., Imig, J. D. and Brands, M. W. (2006) Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H935–H940
- 40 Tabernero, A., Giraldo, J. and Vila, E. (1999) Modelling the changes due to the endothelium and hypertension in the α -adrenoreceptor-mediated responses of rat aorta. *J. Auton. Pharmacol.* **19**, 219–228
- 41 Tang, E. H., Jensen, B. L., Skott, O., Leung, G. P., Feletou, M., Man, R. Y. and Vanhoutte, P. M. (2008) The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E2 in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* **78**, 130–138
- 42 Fortes, Z. B., Costa, S. G., Nigro, D., Scivoletto, R., de Oliveira, M. A. and de Carvalho, M. H. (1992) Effect of indomethacin on the microvessel reactivity of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **316**, 75–89
- 43 Park, D. W., Baek, K., Lee, J. G., Park, Y. K., Kim, J. H., Kim, J. R. and Baek, S. H. (2007) Activation of Toll-like receptor 4 modulates vascular endothelial growth factor synthesis through prostacyclin-IP signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 1090–1095

Received 10 October 2011/21 December 2011; accepted 10 January 2012
 Published as Immediate Publication 10 January 2012, doi:10.1042/CS20110523

APÊNDICE B – Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC. The toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinology & Metabolic Syndrome*. 2011; S:8: 1-8.

The Toll way to hypertension: role of the innate immune response

Gisele Facholi Bomfim^{1,2*}, Theodora Szasz¹, Maria Helena C. Carvalho² and R. Clinton Webb¹¹Department of Physiology, Georgia Health Sciences University, Augusta, GA, United States of America²Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

Abstract

The involvement of pro-inflammatory processes in cardiovascular disease such as hypertension is a well accepted concept. Human hypertension is associated with increased levels of circulating cytokines and their participation in the associated target organ damage has clearly been demonstrated. Recent evidence suggests that at least in animal models of hypertension, components of the adaptive immune system such as T cells are activated and infiltrate target organs, promoting inflammation and thus participating in the maintenance of increased blood pressure. However there is a paucity of information on the role of the innate immune response in hypertension. Moreover, the identity of the original stimuli responsible for the immune system activation as well as the chronology of these events during hypertension pathogenesis is unknown. The current paradigm is that the immune system is activated by danger signals originating from stressed or injured cells and tissues which release molecules (damage-associated molecular patterns or DAMPs) recognized by pattern recognition receptors, such as Toll like receptors, on antigen-presenting cells (APCs). APCs in turn activate the adaptive immune response and both kinds of response will lead to release of pro-inflammatory factors, such as cytokines and chemokines. During hypertension, cytokine/chemokine signaling in the kidney and vasculature may cause further injury and release of DAMPs continuously, resulting in a sustained chronic inflammatory process. In the present review, we describe recent research supporting the hypothesis of the immune system activation as a causative factor of hypertension, with a special focus on the involvement of the innate immune response in the initiation of hypertension and the hypertensive vascular and renal dysfunction.

Keywords: Hypertension; Toll-Like receptor; Innate immune response

Introduction

Hypertension is a chronic disease characterized by systemic high blood pressure and is the most common and important risk factor for the development of cardiovascular diseases. Hypertension affects more than a quarter of the world's adult population and plays a major pathogenic role in the development of cerebrovascular disease, ischemic heart disease, cardiac and renal failure. The etiology of hypertension is heterogeneous and remains elusive. In the last decade, low grade systemic inflammation has been described as an important feature of hypertension. Recent investigations suggest that the innate immune response may be activated by host-derived molecules or DAMPs (damage-associated molecular pattern) leading in turn to activation of the adaptive immune response. The participation of different lymphocyte populations, effectors of the adaptive immune response, has been demonstrated for angiotensin II-induced hypertension [1]. Nevertheless, few authors have discussed the participation of the innate immune response in hypertension, which is responsible for the recognition of the DAMPs and activation of the adaptive response. In this article we will discuss the inflammatory process in hypertension and the contribution of the immune system to this disease state. We will focus on recent data on the participation of innate immune response in hypertension.

Hypertension as a pro-inflammatory disease

Many studies have described an inflammatory process in hypertension. This process can contribute in many ways to the maintenance of high blood pressure and organ damage. Epidemiological and clinical studies have shown strong and consistent relationships between markers of inflammation and hypertension.

The association between inflammatory markers and high blood pressure has been analyzed in animal models and in humans. Some cross-sectional studies showed that, compared to normotensive individuals, the plasma levels of inflammatory markers, such as CRP (C-reactive protein); cytokines (TNF- α - tumor necrosis factor- α and

IL-6); chemokines (MCP-1 - monocyte chemoattractant protein) and adhesion molecules (P-selectin and sICAM-1) are increased in patients with essential hypertension and no evidence of cardiovascular disease [2,3]. Moreover, the levels of specific inflammatory markers such as CRP effectively predict future hypertension, [4,5] suggesting that inflammation may precede and not just follow blood pressure elevation.

A major class of inflammatory molecules present in hypertension that we will discuss is the cytokines. They play an important role in the renal damage and vascular resistance associated with hypertension, and some have clinically been associated with increased arterial stiffness, [6] which independently predicts cardiovascular events in hypertensive patients. They regulate the expression and function of several proteins, including adhesion molecules, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), extracellular matrix components and growth factors, which are important in vessel hypertrophy and vascular dysfunction described in hypertension. Cytokines also seem to influence the balance between vasoconstrictor and vasodilator factors, as well as regional differences in the release and responsiveness to these factors, contributing to the increased responsiveness within a specific vascular bed in hypertension. In perivascular fat and kidney, the cytokines affect adjacent vascular beds and tubular epithelium [7,8]. Here we will describe the main cytokines involved in hypertension.

TNF- α is a pro-inflammatory cytokine generally involved in

*Corresponding author: Gisele Facholi Bomfim, 1120 15th St Physiology CA-3101 Augusta, GA 30912, USA, Tel: 706-721-3547; Fax: 706-721-7299; E-mail: gifacholi@yahoo.com.br

Received November 20, 2011; Accepted December 13, 2011; Published December 16, 2011

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. Endocrinol Metabol Syndrome S8-002. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Copyright: © 2011 Bomfim GF, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metabol Syndrome* S8:002. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Page 2 of 8

neutrophil activation and increased vascular permeability. Besides these acute effects, TNF- α stimulates growth of vascular smooth muscle cells (VSMC) and increases migration. Additionally, it increases the expression of adhesion molecules, other cytokines and metalloproteinases. Studies have shown that the TNF- α antagonist etanercept reduces the hypertension caused by fructose feeding in rats prevents vascular dysfunction and prevents the hypertension caused by angiotensin II infusion [9,10]. Etanercept also reduced blood pressure and attenuated renal damage in a mouse model of systemic lupus erythematosus [11]. In mineralocorticoid and salt-sensitive hypertension models, TNF- α antagonism can also prevent end-organ damage of the kidney, without lowering blood pressure [12,13].

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine that is released from numerous cell types, including endothelial cells, VSMCs, and macrophages. IL-6 stimulates the synthesis of many acute-phase reaction proteins, including C-reactive protein, serum amyloid A and fibrinogen [14]. IL-6 also promotes VSMC proliferation, a hallmark of hypertension and atherosclerosis. Previous work from Lee and colleagues showed that hypertension caused by high-salt diet and angiotensin II was blunted in mice lacking a functional gene for IL-6. Part of this IL-6 effect is explained by increased sodium and water reabsorption as a result of high AT1 receptor density in proximal tubules [15]. Recently, it was also demonstrated that IL-6 levels are increased in kidneys of patients with chronic kidney disease and hypertension [16].

TGF- β 1 is a polypeptide that controls the proliferation and differentiation of some cell types, as lymphocytes. Studies have measured TGF- β 1 mRNA levels in hypertensive rat models and in patients with hypertension. Left ventricular TGF- β 1 mRNA levels are increased in stroke prone SHR and post-myocardial infarcted rat and also in renal cortex of DOCA-salt rats. In essential hypertensive patients, TGF- β 1 mRNA and protein are overexpressed [17]. The Arg(25) and +869T/C polymorphisms in the TGF- β 1 gene are associated with high blood pressure in the human population [18].

Recently, it was described that the novel proinflammatory cytokine IL-17 contributes to hypertension, since IL17-/- mice do not sustain hypertension induced by angiotensin II to the same level as wild type mice [19]. This cytokine is secreted by Th-17 lymphocytes and stimulates the release of other cytokines, ICAM expression and T-cell proliferation.

Vanhala *et al* observed that high levels of IL-1 β , a cytokine involved in monocyte activation and a risk factor for atherogenesis, precede future changes in systolic blood pressure [20]. LPS-stimulated IL-1 β secretion is increased in neutrophils from hypertensive compared to normotensive patients and certain anti-hypertensive agents attenuate this effect [21].

Some laboratories have investigated the effect of anti-inflammatory cytokines in hypertension. For example, recently, Nonaka-Sarukawa and colleagues showed that the anti-inflammatory cytokine IL-10 has a significant antihypertensive effect. They employed adeno-associated virus type 1-based vector in order to sustain serum levels of IL-10 in Dahl salt-sensitive rats and stroke prone SHR and observed that IL-10 has protective actions on the vascular and renal dysfunction [22].

In humans, treatment with immunosuppressives would not be indicated in patients with essential hypertension alone; however, treatment with the immunosuppressive mycophenolate mofetil decreased blood pressure in patients with psoriasis and rheumatoid arthritis and associated hypertension [23].

Another molecule that has been extensively investigated in

hypertension is the nuclear factor κ B (NF κ B). The activation of NF κ B results in the upregulation of adhesion molecules, cytokines and chemokines by vascular endothelial cells and many other cell types. In most cases, cells from infected or injured tissue initiate the inflammatory pathways through NF κ B in response to inflammatory stimuli. NF κ B plays an important role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. McAllister-Lucas *et al* showed that in vascular smooth muscle cells and endothelial cells, angiotensin II activates NF κ B [24]. Rodriguez-Iturbe *et al* showed that in SHR (spontaneously hypertensive rat) the NF κ B activation and immune cell infiltration in the kidney occurred as early as 3 weeks-old when compared to Wistar-Kyoto rats (WKY). Conversely, long-term inhibition of NF κ B using pyrrolidine dicarbamate can result in attenuation of renal interstitial inflammation and in prevention of hypertension in this model [24]. Wu & Schmid-Schonbein also demonstrated the increased activation of NF κ B in kidney and brain hypothalamus, but not in myocardium and cerebral cortex of SHR compared to WKY. They showed that NF κ B expression is involved in the enhanced MMP-2 and MMP-9 activity in SHR [26]. Activation of NF κ B and IKK- β in the normal mouse hypothalamus increased blood pressure via sympathetic-mediated hemodynamic changes and activation of POMC (pro-opiomelanocortin) neurons [27].

Clearly, many studies have described a pro-inflammatory process in hypertension. However many questions still need to be answered, such as how this inflammatory process starts, how the immune system is activated, and what are the possible molecules or signaling events/pathways involved in this response.

Immune response

The main function of the immune system is defending a host against pathogen invasion. For this function the immune response is a complex system that has two main arms: innate immunity, which mediates the early reactions, and adaptive immunity, which is a late and more specific response.

Innate immune response: The innate immune response is the first line of defence against antigens. This kind of response is able to recognize different antigens, process them and present molecules from this antigen to cells of the adaptive immune response, which will develop a specific response against this molecule. In addition to the defensive function of this system, it must also be able to distinguish between infection and tissue damage and know how to respond appropriately to these two scenarios.

In the 1950, Frank Burnet postulated the concept of self-non-self of immunity, where the immune system can discriminate between self and non-self, and lymphocytes specific to self antigens are eliminated to prevent immune reactions against one's own antigens. Together with his colleague Peter Medawar, Burnet won the Nobel Prize in Medicine in 1960 for this theory.

Subsequently, a major modification to this concept was proposed by Charles Janeway, Jr, in the late 80s, when he introduced the "infectious non-self model". In this theory, he introduced the antigen-presenting cells (APCs) and the co-stimulatory molecules into the model. The APCs are activated via encoded pattern recognition receptors (PRRs) that recognize conserved pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on bacteria. On activation, APCs up-regulate costimulatory signals (MHC, B7), process the antigens, and present them to passing T cells. In his view, the PRRs allow APCs to discriminate between "infectious-nonself" and "noninfectious-self". All these concepts were instrumental in understanding many aspects of the immune response; however, they failed to explain other immunological phenomena, such as the inflammatory process in autoimmune diseases.

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metabol Syndr* 8:002. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Page 3 of 8

In the 90s, Polly Matzinger introduced a novel idea known as the danger model. Briefly, this model hypothesizes that the cells of the innate immune response are activated not by the infections non-self, but by danger or alarm signals generated from injured host cells, damaged tissues or metabolic stress. Thus, the primary function of the immune system is to detect and protect the host against danger and the initiation of the immune response is not the foreignness or strange microbes (non-self), but its function is to detect alarm signals generated from injured or damaged cells and tissues. As Matzinger highlighted in an excellent review [28], alarm signals can be constitutive or inducible, intracellular or secreted, or even a part of the extracellular matrix. Because cells dying by normal programmed processes are usually scavenged before they disintegrate, they do not generate danger signals. However cells that die from necrosis release their contents and therefore any intracellular product could potentially be a danger signal. Inducible alarm signals can include any substance made, or modified, by distressed or injured cells. To conform to the term "pathogen associated molecular pattern" (PAMP), the term "damage associated molecular pattern" (DAMP) was subsequently coined for these endogenous danger signals. The identification of these stimuli and putative receptors has provided significant insight into the initiation and regulation of innate immune response.

The main APCs present in the body are macrophages/monocytes, dendritic cells, B lymphocytes, vascular endothelial cells as well as epithelial and mesenchymal cells. These cells recognize PAMPs and DAMPs by pattern recognition receptors (PRRs). These receptors can be classified into cell-associated (TLR, NLR (NOD-like receptors), RLR, Dectin) and secreted forms (C1q and MBP, mannose binding protein). Some of these cell-associated receptors are found either on the plasma membrane (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) or in association with the membranes of endosomes, the endoplasmic reticulum or endolysosomes (TLR3, TLR7, TLR9). There are also cell-associated PRR that are present intracellularly in the cytosol (RLR, NLR). Generally, following interaction with appropriate ligands, the PRRs activate certain transcription factors which then translocate to the nucleus to turn on and upregulate genes involved in host defense and inflammation (e.g., proinflammatory cytokines). A constant and excessive activation of PRR contribute to the development of autoimmunity and the induction of sepsis [29].

The most extensively described PRR that can recognize and be activated by DAMPs are the TLR. For this reason, in the following section we will review the TLR signaling and the studies that describe the role of these receptors in hypertension.

Toll like receptors

The TLR receptor family was the first pattern recognition receptor to be identified. TLRs are type I transmembrane proteins of the interleukin-1 receptor family that possess an amino-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain for ligand binding, a single transmembrane domain and a carboxy-terminal intracellular signaling domain. These intracellular domains are able to trigger signaling pathways known to activate the nuclear factor kappa B (NF- κ B), which in turn leads to the secretion of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-8. TLRs are widely expressed by many cell types. TLR ligands are varied, consisting of bacterial cell wall components; bacterial genomic DNA; viral, fungal and parasitic products; and synthetic analogs of natural products. However, TLRs can also bind autologous (self) molecules such as heat shock proteins (HSPs), intercellular matrix products, mitochondrial DNA and mammalian genomic DNA, revealing that the TLR immune system is concerned with damage signals from injured tissue. It is suggested that TLRs recognize not only PAMPs, but also

stress- or damage-associated molecular patterns. However how TLRs are able to discriminate between ligands is still poorly understood.

The first TLR pathway described requires two adaptor proteins, MyD88 (myeloid differentiation factor 88) and Mal (MyD88 adaptor-like). These adaptors recruit IRAK4 and IRAK1 (serine/threonine kinases) to trigger the activation of TRAF6 and IKK complex, resulting in quick or early activation of the transcription factor NF- κ B. The second pathway requires TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β) and TRAM (TRIF-related adaptor molecule). This pathway induces late NF- κ B activation and LPS-mediated phosphorylation, as well as dimerization of the transcription factor IRF (interferon regulatory factors), resulting in IFN- α and IFN- β production and activation of acquired immunity. Both MyD88/TRAF6 and TRAM/TRIF complexes can activate TRAF6, which induces MAPK activation. Recently, two more adaptor proteins were described: TRAM (Toll-receptor-associated molecule) and SARM (sterile alpha and HEAT/Armadillo motif protein). TRAM transduces signals from all of the TIR (Toll/interleukin-1 receptor homologous region) domains, activating protein kinases and then transcription factors that cause inflammatory effects. The function of SARM has yet to be defined, but it was described as a negative adaptor. The adaptor protein MyD88, which is recruited by the Mal adaptor protein, is utilized by all kinds of TLR receptors, but not by TLR3 (Figure 1) [30].

TLR signaling pathways induced by endogenous molecules in different cell types are poorly investigated, but recent studies report usage of distinct signaling pathways downstream of TLRs when stimulated by exogenous or endogenous molecules. Activation of TLR4 by LPS can induce both TRIF and MyD88-dependent pathways. In contrast, studies have shown that the endogenous TLR4 agonist tenascin-C signals via MyD88. Similarly, biglycan has been shown to signal through TLR2 and TLR4 in a MyD88-dependent manner [31].

Figure 1: Toll-like receptor 4 (TLR-4) and hypertension. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) such as those listed in Table 1, bind to and activate TLR4, which exists as a homodimer in the plasma membrane of many cell types. Activated TLR4 recruits adaptor proteins complexes MyD88/MAL and TRAM/TRIF, which in turn recruit and activate IRAK4, IRAK1, TRAF6 and IRF3, leading to MAPK (Erf and p38) and NF- κ B activation and subsequent release of pro-inflammatory molecules such as cytokines and reactive oxygen species (ROS). The resulting inflammatory damage of the blood vessel, heart, kidney and central nervous system contributes to the pathogenesis of hypertension.

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metabol Syndrome S8:002*. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Page 4 of 8

In view that TLRs are expressed in many tissues, including the cardiovascular system and kidney and that these receptors are activated by endogenous ligands, many authors have been focusing on the role of TLR in cardiovascular diseases [32].

The most studied area of cardiovascular disease and TLRs is atherosclerosis. Studies using knockout mice for TLR4, CD14 and MyD88 have demonstrated that TLR4 has an important role in the development of atherosclerosis. Double homozygous progeny of TLR4 knockout mice crossed with the atherosclerosis-prone apolipoprotein E (ApoE) knockout mice exhibited reduced atherosclerosis when compared with ApoE knockout controls [33]. The same were observed in MyD88-ApoE and CD14-ApoE double-knockout mice [34] confirming the proatherogenic effect to TLR4.

In addition to atherosclerosis, the involvement of TLR4 has also been shown in angiogenesis and in diseases such heart failure, ischemic injury and septic cardiomyopathy [32]. However few works have studied the beginning of the story, that is, when and how the TLR4 start to be activated and contribute to the development of all these diseases. One important question that must be answered is whether the risk factors for the development of cardiovascular disease can activate this receptor and initiate the inflammatory process in these conditions. One of the main and most studied risk factor is hypertension. Nevertheless the role of TLR4 in hypertension is still uncertain.

One of the first studies that started to associate high blood pressure with TLR4 was one published by Ha *et al* [35] in 2005. They showed that TLR4-deficient mice subjected to aortic banding for 2 weeks and with pressure overload had reduced cardiac hypertrophy when compared to wild type mice [35].

Another study conducted by Eissler *et al* [36] showed that TLR4 expression is increased in hearts from adolescent and adult SHR compared to those from WKY rats, suggesting that a brief period of elevated blood pressure was needed to induce this receptor. They also showed an enhancement in TLR4 expression in WKY rats treated with L-NAME, another hypertensive model. Treatment with ramipril (angiotensin converting enzyme inhibitor) decreased TLR4 expression in these models, showing that the expression of TLR4 is modulated by blood pressure [36].

Sales *et al* found that the polymorphism TLR4 variant Asp299Gly and TLR6 variant Ser249Pro is associated with lower left ventricular wall thickness and left ventricular mass in hypertensive women, but the same association was not found in men. In the same work, they described that monocytes from hypertensive women carrying TLR6 polymorphism exhibited diminished zymosan-induced cytokine release (TNF- α and IL-6) compared with sex-matched cells carrying the Pro allele. They also showed that heterozygous monocytes from hypertensive subjects with TLR4 polymorphism of both genders exhibited a lower production of IL-6 after been stimulated with LPS, compared to hypertensive individual without TLR4 polymorphism [37,38].

We recently observed increased TLR4 mRNA expression not only in the heart but also in the kidney and mesenteric resistance arteries from SHR of 15 weeks of age compared with Wistar and SHR of 5 weeks-old (normotensive). We also treated SHR with antibody anti-TLR4, to block the activation of this receptor, and observed that this treatment decreased blood pressure and inflammatory markers (IL-6, TNF- α and NFkB) and ameliorated the abnormal contractile function of mesenteric resistance arteries.

In summary, these studies describe, in part, the participation of

TLR4 in hypertension. However many questions must be answered about the activation of this receptor in the kidney, central nervous system and vessels that are important organ which contribute to blood pressure regulation. Another question is what is the ligand(s) responsible for TLR4 activation in hypertension, and whether more types of TLR are involved in this condition.

DAMPs in hypertension

The innate immune response is effective and necessary when fighting limited pathological situations. Cellular PRRs are also crucial to mounting an effective inflammatory response. However, if the stimuli persist and inflammation becomes chronic, the immune response can produce complex results which, although initially protective, can eventually lead to tissue damage and cause localized or even systemic disease. Hypertension is an example of chronic inflammatory disease, and many DAMPs are present in this condition contributing to persistent inflammation (Figure 2).

Recognition of host-derived molecules by TLRs and subsequent TLR activation may be an important link between hypertension and activation of the immune system. Many studies have clearly shown that TLR4 is responsible for inflammation induced by endogenous ligands, such as C-reactive protein and heat shock proteins (HSP60 and HSP70) in smooth muscle cells and many other cell types. In hypertension, the circulating levels of these molecules are increased and they could act as long-term TLR4 activators, resulting in augmented expression of several pro-inflammatory cytokines in cardiovascular tissues. In table 1 we list several examples of potential TLR activators in hypertension and what type of TLR and cell it was described to be activating. This list is by no means exhaustive, as numerous other yet unknown molecules may fulfill our inclusion criteria of being TLR ligands that are augmented during hypertension.

HSP60 and HSP70: The heat shock proteins are molecular

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metabol Syndr* S8:002. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Page 5 of 8

DAMPs	TLR	Cell type	Reference
HSP 60	2, 4	cardiomyocytes	Kim <i>et al.</i> , 2009
HSP 70	2, 4	macrophage, cardiomyocytes	Asea, A <i>et al.</i> , 2002; Mathur S. <i>et al.</i> , 2011
Angiotensin II	4	VSMC	Ji, Y <i>et al.</i> , 2009
C-reactive protein	4	VSMC	Liu, N <i>et al.</i> , 2010; Li, N <i>et al.</i> , 2011
Oxidized LDL	4	macrophage	Miller, YI <i>et al.</i> , 2003
HMGB-1	2, 4	macrophage	Park, J <i>et al.</i> , 2004
Fibrinogen	4	cardiomyocyte, monocytes	Li, T <i>et al.</i> , 2009; Kuhns D. <i>et al.</i> , 2007
Uric acid	2, 4	macrophage	Liu-Bryan, R. <i>et al.</i> , 2005
ADMA	4	adipocyte	Yang, Z.C. <i>et al.</i> , 2009

VSMC: vascular smooth muscle cells; HSP: heat shock protein; HMGB: high mobility group protein
LDL: low density lipoprotein; ADMA: asymmetric dimethylarginine

Table 1: Damage-associated molecular patterns (DAMPs) that are present in higher levels in hypertension and are known to activate Toll-like receptors (TLR).

chaperones involved in folding and unfolding of other proteins. Their expression is increased when cells are exposed to high temperatures or other stress conditions such as inflammation and infection. Elevated blood pressure is a mechanical stress to the endothelium – theoretically it may be a factor inducing enhanced expression of HSP on the endothelial cell surface. In patients with hypertension, it was described that HSP70 is increased in kidney and in lymphocytes [39]. Hypertensive humans also exhibit increased plasma levels of HSP60 compared to normotensive individuals [3]. Animal models have also revealed a relationship between elevated blood pressure and increased expression of HSP [40].

Many fragments from HSP70 and HSP60 are immunogenic and it was demonstrated that these proteins can stimulate macrophages to release TNF- α and synthesize NO in a TLR4-dependent manner [41,42]. Mathur *et al.* showed that HSP70 induces an inflammatory signal via TLR2 and MyD88, using primary cardiomyocytes isolated from TLR2 and MyD88 knockout mice. Another group has demonstrated that HSP60-induced apoptosis in cardiac myocytes is TLR4 dependent [43,44].

Angiotensin II: Angiotensin II (Ang II) is a main peptide hormone of the renin-angiotensin system. Ang II causes endothelial dysfunction, VSMC proliferation and migration, and stimulates inflammatory processes in many cells of the body, including vascular tissue and kidney. Furthermore, Ang II is able to stimulate vascular cells to produce cytokines (e.g. CRP, IL-6, VCAM-1, MCP-1) and growth factors (e.g. PDGF and VEGF) via receptor activation and subsequent activation of multiple intracellular signaling pathways, which contribute to vascular inflammation and cardiovascular disorders.

Ji *et al.* [45] demonstrated for the first time that Ang II induces inflammatory responses partly via TLR4-dependent mechanisms in VSMCs. They showed that Ang II activates TLR4 through AT1 receptor and subsequent ERK1/2 activation in VSMCs [45].

Another study demonstrated that Ang II blockade via losartan administration decreases the innate immune response caused by cyclosporine-induced renal injury, by decreasing TLR2 and MHC class II protein expression and the number of infiltrated and matured dendritic cells in the rat kidney [46].

C-Reactive Protein (CRP): CRP is an acute phase reactant produced by hepatocytes. The concentration of CRP increases 4 to 6 hours after acute tissue injury or inflammation and declines rapidly with resolution of the injurious process. CRP is considered an independent predictor

of cardiovascular disease and has been associated with increased risk for development of hypertension [47]. CRP induces pro-inflammatory cytokine release from human monocytes and up-regulates CCR-2, NADPH oxidase and NF κ B activity. Higher levels of CRP may increase blood pressure by reducing nitric oxide production in endothelial cells, resulting in vasoconstriction and increased production of endothelin-1 [48]. CRP may also function as a proatherosclerotic factor by up-regulating AT1 receptor expression [4].

A study demonstrated that CRP is able to stimulate IL-6 and TNF- α production in vascular smooth muscle cells via NF κ B and MyD88-independent TLR4 signaling pathway [49]. The same group also showed that the stimulation of TLR4 by CRP increases the expression of VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) and iNOS (inducible nitric oxide synthase) [50].

Fibrinogen: Fibrinogen is a soluble protein that is mainly secreted by hepatic cells and is involved in the coagulation cascade. In conditions such as inflammation, tissue injury and neoplasia, circulating levels of fibrinogen are elevated and stimulate its extracellular deposition. At sites of inflammation, fibrinogen mediates the adhesion of leukocytes to vascular endothelium through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), stimulates macrophage chemokines secretion and fibroblast replication, and potentiates endothelial cell proliferation stimulated by fibroblast growth factor-2. Plasma fibrinogen has been considered as a risk factor for cardiovascular disease and is associated with cardiovascular abnormalities, such as left ventricular hypertrophy [51]. Shear-stress-induced deposition of fibrinogen promotes atherosclerosis [52]. Many studies have demonstrated an increase in fibrinogen levels in hypertension, mainly in the presence of target organ damage [3].

In vitro studies showed that fibrinogen stimulation induces a hypertrophic response of neonatal cardiomyocytes and activates the TLR4/MyD88-dependent NF κ B signaling pathway [53]. Other work showed that human monocytes and murine and human macrophages stimulated with fibrinogen increase the production of pro-inflammatory cytokines via the TLR4 pathway [54].

High mobility group box-1 (HMGB1): HMGB1 is a highly conserved, ubiquitous protein in the nucleus and cytoplasm of almost all cells. HMGB-1 can be found in plasma, generally derived from necrotic cells. After binding to its receptors, the receptor for advanced glycation end products (RAGE) or TLR4 [55]. HMGB1 activates macrophages/monocytes and vascular endothelial cells which express proinflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Thus, HMGB1 may act as a critical mediator of inflammation and promote tissue repair and regeneration [56]. Many recent studies demonstrated that HMGB1 plays a pivotal role in cardiovascular diseases, such as atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion injury, heart failure and myocardial infarction [57].

Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL): Ox-LDL originates mainly from mild oxidation in the arterial wall by cell-associated lipoxygenase and/or myeloperoxidase. These molecules contribute to endothelial damage and induce atherosclerosis by stimulating monocyte infiltration and VSMC migration and proliferation. Increased LDL oxidation levels were found in young men with borderline hypertension and decreased arterial elasticity. Another study in humans showed that ox-LDL has a negative correlation with protective prostacyclin in hypertensive patients [58].

An interesting review published by Miller Y. *et al.* [59] describes how ox-LDL is recognized by receptors of innate immunity. The authors discuss that minimally modified LDL and oxidized phospholipids

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metabol Syndr* 8:002. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Page 6 of 8

have been found to bind CD14 or activate TLR4 on macrophages [59]. In turn, various biological processes are induced, including the stimulation of cytoskeletal rearrangement that alters phagocytic activity and the stimulation of cytokine secretion.

Uric acid: Uric acid contributes to pathogenesis of hypertension in a rat model through the activation of the renin-angiotensin system, down regulation of nitric oxide, and induction of endothelial dysfunction and vascular smooth muscle proliferation [60]. In 2010, a meta-analysis of published prospective studies showed that hyperuricemia is associated with an increased risk of incident hypertension, independent of other risk factors. This risk appears more pronounced in younger individuals and women [61].

Uric acid has been described as the main immunogenic molecule released by necrotic cells. Shi *et al* [62] isolated major danger signals from necrotic cells by HPLC and identified uric acid as a primary component of dendritic cell activation fraction [62]. Another group demonstrated that TLR4, TLR2 and MyD88 null macrophages had decreased responses to uric acid exposure, in terms of production of IL-1 β , TNF- α , CXCL1 and TGF β 1, suggesting that TLR2 and TLR4 are receptors for uric acid [63].

ADMA (asymmetric dimethylarginine): ADMA is an endogenous nitric oxide synthase inhibitor which has potent pressor/vasoconstrictor effects. Studies demonstrated a close association between plasma ADMA levels and carotid intima-media thickness, one of the markers of atherosclerosis in the general population [64]. In Dahl-salt rats fed high salt diet the urinary ADMA excretion is increased and it is positively correlated with arterial pressure. This increase in ADMA was not found in SHR [65]. Recently, Yang *et al* showed that ADMA and oxidants activate TLR4 in adipocytes, however no work has described the activation of TLR4 by ADMA in other cell types [66].

Shear stress: Shear stress may first modify the properties of the plasma membrane and then affect ion channels, receptors, adhesion proteins, and the phosphorylation status of signalling molecules. Mechanical stress itself is also considered an important stimulus for the activation of cells of the innate immune system. As discussed above, the immune system recognizes endogenous and exogenous molecules. However, additionally, the danger model proposes that the immune system may be activated also by degradation products such as heparan sulfate and polysaccharide fragments of hyaluronan, which indicate tissue injury, infection, and tissue remodelling [67]. Recent reports have also shown that hyaluronic acid, a glycosaminoglycan found in the extracellular matrix, can also activate dendritic cells by engaging TLR2. Thus stimulation by host-derived extracellular matrix factors may serve as an intrinsic mechanism for initiating an inflammatory response after tissue injury.

Adaptive immune response and hypertension

During the immune response, after cells from the innate immune response recognize the antigen by the PRRs, they will migrate and present molecules from this antigen to cells of the adaptive immune response. The adaptive immune response is initiated by the recognition of foreign antigens by specific lymphocytes. Lymphocytes respond by proliferating and by differentiating into effector cells, whose function is to eliminate the antigen, and into memory cells, which show enhanced responses upon subsequent encounters with the antigen.

The two major cell types of the adaptive immune response are B and T lymphocytes. The participation of T lymphocytes to the pathogenesis

of hypertension was demonstrated by Guzik *et al.* [1] who in 2007 found that mice lacking T-lymphocytes are resistant to the development of both angiotensin II and DOCA-salt induced hypertension. Adoptive transfer of T, but not B cells restored hypertension in these animals [1]. Another group showed that SCID mice, which lack both T and B lymphocytes, have a blunted blood pressure response and reduced sodium retention during angiotensin II-induced hypertension [68].

The same group also reported that IL-17 produced by Th17 lymphocytes plays a critical role in maintenance of Ang II-induced hypertension and vascular dysfunction. IL-17 is increased in T cells from Ang II-infused mice and IL-17 knockout mice infused with Ang II had less blood pressure elevation than control mice [19].

In an abstract presentation by Thabet *et al.*, the authors showed that mice lacking CD8 lymphocytes are resistant to Ang-II induced hypertension when compared to wild type C57BL/6j mice [70]. In contrast, Ang-II-induced hypertension is increased in knockout mice to CD4 lymphocytes, compared to CD8 knockout and wild type C57BL/6j mice. This work suggests an important contribution of CD8 lymphocytes and not CD4 lymphocytes to hypertension induced by Ang II.

Another type of T cell which has a role in hypertension is the T regulatory cell (Treg). These cells suppress innate and adaptive responses. Recently, Barhoumi *et al* demonstrated that Treg adoptive transfer prevented Ang II-induced hypertension, vascular damage and immune cell infiltration [69].

Although several studies have described the importance of lymphocytes in hypertension, the question still remains as to how exactly the adaptive immune response is activated in the first place in these models of hypertension. Another point is what are the antigens that activate the innate immune response, and which PRRs are responsible for this response.

Conclusion

In this review, we described recent evidence supporting the role of the innate immune system in hypertension. We propose that in hypertension, elevated levels of DAMPs activate TLRs such as TLR4 on APCs which then signal directly or through cells of the adaptive immune response to elicit an inflammatory process in organs and systems that regulate blood pressure. One important question that still remains unanswered is whether DAMP activation of TLR occurs before the initial blood pressure increase (cause), as a consequence of high blood pressure damage of target organs (effect), or both (positive feedback loop). The vast majority of studies linking the immune response and hypertension were performed in animal models and definitive proof in humans is still lacking. However, understanding these interactions may allow for manipulation of the immune system as a therapeutic tool in resistant hypertension and/or hypertensive target organ damage.

References

1. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, *et al.* (2007) Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204: 2449-2460.
2. Stumpf C, John S, Jukic J, Yilmaz A, Raaz D, *et al.* (2005) Enhanced levels of platelet P-selectin and circulating cytokines in young patients with mild arterial hypertension. *J Hypertens* 23: 995-1000.
3. Jastrzebski M, Czarnecka D, Rajzer M, Kawecka-Jaszcz K (2006) Increased levels of inflammatory markers in hypertensives with target organ damage. *Kardiol Pol* 64: 802-809 discussion 810-801.
4. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, *et al.* (2003) C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA* 290: 2945-2951.

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metabol Syndrome S8:002*. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Page 7 of 8

5. Niskanen L, Laaksonen DE, Nyyssonen K, Punnonen K, Valkonen VP, et al. (2004) Inflammation, abdominal obesity, and smoking as predictors of hypertension. *Hypertension* 44: 859-865.
6. Mahmud A, Feely J (2005) Arterial stiffness is related to systemic inflammation in essential hypertension. *Hypertension* 46: 1118-1122.
7. Sprague AH, Khalil RA (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78: 539-552.
8. Granger JP (2006) An emerging role for inflammatory cytokines in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: 923-924.
9. Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH (2009) Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem* 330: 219-228.
10. Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, Dechend R, Mervaala E, et al. (2002) Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol* 161: 1679-1693.
11. Venegas-Pont M, Manigrasso MB, Grifoni SC, LaMarca BB, Maric C, et al. (2010) Tumor necrosis factor- α antagonist etanercept decreases blood pressure and protects the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension* 56: 643-649.
12. Elmarakby AA, Quigley JE, Imig JD, Pollock JS, Pollock DM et al. (2008) TNF- α inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: 76-83.
13. Elmarakby AA, Quigley JE, Pollock DM, Imig JD (2006) Tumor necrosis factor α blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 47: 557-562.
14. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE (2000) Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 21: 1574-1583.
15. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, Osborne JB Jr, Fleming C, et al. (2006) Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: 935-940.
16. Zhang W, Wang W, Yu H, Zhang Y, Dai Y, et al. (2011) Interleukin 6 Underlies Angiotensin II-Induced Hypertension and Chronic Renal Damage. *Hypertension*
17. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH (2003) Association between transforming growth factor- β and hypertension. *Am J Hypertens* 16: 604-611.
18. Yan-Yan L (2011) Transforming growth factor β 1 +989T/C gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2708 participants in the Chinese population. *Intern Med* 50: 1089-1092.
19. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, et al. (2010) Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 55: 500-507.
20. Mauno V, Hannu K, Esko K (2008) Proinflammation and hypertension: a population-based study. *Mediators Inflamm* 2008: 619704.
21. Nemat F, Rahbar-Roshandel N, Hosseini F, Mahmoudian M, Shafiei M (2011) Anti-inflammatory effects of anti-hypertensive agents: influence on interleukin-1 β secretion by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes from patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 33: 66-76.
22. Nonaka-Sarukawa M, Okada T, Ito T, Yamamoto K, Yoshioka T, et al. (2008) Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt sensitive rats. *J Gene Med* 10: 368-374.
23. Herrera J, Ferrebuz A, MacGregor EG, Rodriguez-Iturbe B (2006) Mycophenolate mofetil treatment improves hypertension in patients with psoriasis and rheumatoid arthritis. *J Am Soc Nephrol* 17: 218-225.
24. McAllister-Lucas LM, Jin X, Gu S, Siu K, McDonnell S, et al. (2010) The CARMA3-Bcl10-MALT1 signalosome promotes angiotensin II-dependent vascular inflammation and atherogenesis. *J Biol Chem* 285: 25880-25884.
25. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Mezzano S, et al. (2005) Early and sustained inhibition of nuclear factor- κ B prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 51-57.
26. Wu KI, Schmid-Schonbein GW (2011) Nuclear factor κ B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 57: 261-268.
27. Purkayastha S, Zhang G, Cai D (2011) Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- β and NF- κ B. *Nat Med* 17: 883-887.
28. Matzinger P (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305.
29. Sirisinha S (2011) Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol* 29: 1-14.
30. Beutler B (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430: 257-263.
31. Piccinini AM, Midwood KS (2010) DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010: 672395.
32. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J (2007) Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4: 444-454.
33. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, et al. (2004) Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10679-10684.
34. Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, et al. (2004) Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 10: 416-421.
35. Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, Gao X, et al. (2005) Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res* 68: 224-234.
36. Eissler R, Schmauder C, Rusai K, Kuhne L, Sollinger D, et al. (2011) Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity. *Hypertens Res* 34: 551-558.
37. Sales ML, Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Fernandes MN, Piveta C, et al. (2010) The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. *Clin Chim Acta* 411: 744-748.
38. Sales ML, Schreiber R, Ferreira-Sae MC, Fernandes MN, Piveta CS, et al. (2010) Toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism is associated with lower left ventricular wall thickness and inflammatory response in hypertensive women. *Am J Hypertens* 23: 649-654.
39. Kunes J, Poirier M, Tremblay J, Hamet P (1992) Expression of hsp70 gene in lymphocytes from normotensive and hypertensive humans. *Acta Physiol Scand* 146: 307-311.
40. Moen RJ, La Voi KP, Zhang M, Blake MJ (1998) Clonidine-Induced Heat-Shock Protein Expression in Rat Aorta. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 3: 171-184.
41. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, et al. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277: 15028-15034.
42. Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, et al. (2002) Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 23: 130-135.
43. Kim SC, Stice JP, Chen L, Jung JS, Gupta S, et al. (2009) Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circ Res* 105: 1186-1195.
44. Mathur S, Walley KR, Wang Y, Indrambarya T, Boyd JH (2011) Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circ J* 75: 2445-2452.
45. Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N (2009) Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 23: 265-276.
46. Ahn KO, Lim SW, Li C, Yang HJ, Ghee JY, et al. (2007) Influence of angiotensin II on expression of toll-like receptor 2 and maturation of dendritic cells in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* 83: 938-947.
47. Bautista LE, Lopez-Jaramillo P, Vera LM, Casas JP, Otero AP, et al. (2001) Is C-reactive protein an independent risk factor for essential hypertension? *J Hypertens* 19: 857-861.
48. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, et al. (2002) Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 105: 1890-1896.

Citation: Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC (2011) The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metabol Syndrome* S8:002. doi:10.4172/2161-1017.S8-002

Page 8 of 8

49. Liu N, Liu J, Ji Y, Lu P, Wang C, et al. (2011) C-reactive protein induces TNF- α secretion by p38 MAPK-TLR4 signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Inflammation* 34: 283-290.
50. Liu N, Liu J, Ji Y, Lu P (2010) Toll-like receptor 4 signaling mediates inflammatory activation induced by C-reactive protein in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 25: 467-476.
51. Koenig W (2003) Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update. *Thromb Haemostasis* 89: 601-609.
52. Orr AW, Sanders JM, Bevard M, Coleman E, Sarembock IJ, et al. (2005) The subendothelial extracellular matrix modulates NF- κ B activation by flow: a potential role in atherosclerosis. *J Cell Biol* 169: 191-202.
53. Li T, Wang Y, Liu C, Hu Y, Wu M, et al. (2009) MyD88-dependent nuclear factor- κ B activation is involved in fibrinogen-induced hypertrophic response of cardiomyocytes. *J Hypertens* 27: 1084-1093.
54. Smiley ST, King JA, Hancock WW (2001) Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167: 2987-2994.
55. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, et al. (2004) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 279: 7370-7377.
56. Wang H, Yang H, Tracey KJ (2004) Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 255: 320-331.
57. Li W, Sama AE, Wang H (2006) Role of HMGB1 in cardiovascular diseases. *Curr Opin Pharmacol* 6: 130-135.
58. Kuklinska AM, Mroczko B, Musial WJ, Urowicz-Szarynska M, Sawicki R, et al. (2009) Diagnostic biomarkers of essential arterial hypertension: the value of prostacyclin, nitric oxide, oxidized-LDL, and peroxide measurements. *Int Heart J* 50: 341-351.
59. Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL (2003) Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol* 14: 437-445.
60. Feig DI, Kang DH, Nakagawa T, Mazzali M, Johnson RJ (2006) Uric acid and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 8: 111-115.
61. Grayson PC, Kim SY, LaValley M, Choi HK (2011) Hyperuricemia and incident hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 63: 102-110.
62. Shi Y, Evans JE, Rock KL (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425: 516-521.
63. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R (2005) Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 62: 2936-2946.
64. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, et al. (1999) Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 99: 1141-1146.
65. Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, et al. (1997) Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension* 29: 242-247.
66. Yang ZC, Wang KS, Wu Y, Zou XO, Xiang YY, et al. (2009) Asymmetric dimethylarginine impairs glucose utilization via ROS/TLR4 pathway in adipocytes: an effect prevented by vitamin E. *Cell Physiol Biochem* 24: 115-124.
67. Tsan MF, Gao B (2004) Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 76: 514-519.
68. Crowley SD, Song YS, Lin EE, Griffiths R, Kim HS, et al. (2010) Lymphocyte responses exacerbate angiotensin II-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: 1089-1097.
69. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, et al. (2011) T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension* 57: 469-476.
70. Thabet SR, Wu J, Chen W, Marvar P, Gongora MC, et al. (2011) The role of CD8 α , IP-10 and MMP12 in hypertension. *Hypertension* 58: e33-e183.

This article was originally published in a special issue, *Cardovascular and Immunological Diseases* edited by Editor(s): Dr. Włodzisław Luczynski, Medical University of Białystok, Poland

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 200 Open Access Journals
- 15,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Inspec, Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Options: Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submit>