

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Olga Lucia Maquilon Moreno

PAPEL DO RECEPTOR TLR4 NO EFEITO ANTICONTRÁTIL DO PVAT

Belo Horizonte—MG
2025

Olga Lucia Maquilon Moreno

PAPEL DO RECEPTOR TLR4 NO EFEITO ANTICONTRÁTIL DO PVAT

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Professor Dr. Luciano dos Santos
Aggum Capettini

Belo Horizonte – MG

2025

043

Moreno, Olga Lucia Maquilon.

Papel do receptor TLR4 no efeito anticontrátil do PVAT [manuscrito] / Olga Lucia Maquilon Moreno. – 2025.

89 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Professor Luciano dos Santos Aggum Capettini.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Receptor 4 Toll-Like. 3. Óxido Nítrico. 4. Estresse Oxidativo. 5. Lipopolissacarídeos. 6. Células Endoteliais. I. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

"PAPEL DO RECEPTOR TLR4 NO EFEITO ANTICONTRÁTIL DO PVAT"

OLGA LUCIA MAQUILON MORENO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **10 de dezembro de 2025**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROFA. DRA. CAROLINA ROSA GIODA - ICB/FURG

PROF. DR. KINULPE HONORATO SAMPAIO - UFVJM

PROF. DR. DIOGO DE BARROS PERUCHETTI - ICB/UFMG

PROFA. DRA. JULIANA CARVALHO TAVARES - ICB/UFMG

PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI, ORIENTADOR - ICB/UFMG

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2025



Documento assinado eletronicamente por **Kinulpe Honorato Sampaio, Usuário Externo**, em 23/12/2025, às 15:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Carvalho Tavares, Professora do Magistério Superior**, em 23/12/2025, às 15:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Rosa Gioda, Usuária Externa**, em 26/12/2025, às 12:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diogo de Barros Peruchetti, Professor do Magistério Superior**, em 26/12/2025, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 04/02/2026, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4845410** e o código CRC **06C14F35**.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao professor Luciano dos Santos Aggum Capettini, cujo acolhimento, convivência e ensinamentos marcaram profundamente minha trajetória. Sou imensamente grata por acreditar em mim e tornar possível meu crescimento acadêmico e profissional.

À minha mãe, Maria, meu maior exemplo de fé, coragem e perseverança; às minhas irmãs, Sandra, Margarita e Vanessa; e ao meu esposo, Carlos, por serem minha base, meu refúgio e minha força diária. A Deus, por iluminar meu caminho e tornar meus sonhos possíveis; e à memória do meu querido pai, Leo, cuja presença sinto em cada conquista, mesmo em seu eterno descanso.

Aos meus colegas e amigos do laboratório CPCT, Thaís, Enes, Melissa e Edenil, agradeço pelo carinho, pela disponibilidade, pela parceria e por tornarem meus dias mais leves e felizes. Estendo minha gratidão também aos demais colegas que fizeram parte dessa jornada.

Aos meus amigos Ilder, Lucas e Alejandra, por cada gesto de apoio, pelo carinho sincero e pelo acolhimento constante durante todos os anos que compartilhamos no ICB. Sua presença fez toda a diferença.

À professora Jacqueline Isaura Alvarez Leite, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, expresso minha profunda gratidão pela dedicação e pela valiosa colaboração técnica no uso do biotério, essencial para a criação, experimentação e evolução deste projeto.

Aos professores e colegas envolvidos no meu projeto, assim como aos técnicos de laboratório e do biotério, deixo meu agradecimento mais sincero pelo apoio generoso, pelas contribuições e pelas sugestões que enriqueceram imensamente este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e pelas contribuições cuidadosas.

Ao Brasil e à UFMG, por me acolherem e permitirem que eu realizasse o sonho do doutorado. À agência de fomento CAPES, pela confiança e pelo apoio que tornaram esta jornada possível.

“Na complexidade dos vasos e das moléculas que os permeiam, a natureza nos revela como se mantém o equilíbrio da vida.”

— Autor desconhecido

RESUMO

Estudos prévios demonstram que a deleção gênica do receptor Toll-like 4 (TLR4) compromete significativamente a função vascular. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar o papel modulatório do TLR4 sobre o efeito anticontrátil do tecido adiposo perivascular (PVAT) e sua interação com as células endoteliais em condições fisiológicas, avaliando especificamente os efeitos do agonismo agudo do TLR4 induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS). Em células endoteliais humanas (EA.hy926), a estimulação com LPS (1 µg/mL) promoveu redução da produção basal de óxido nítrico (NO) nos primeiros 30 minutos, seguida, após 1 hora, por aumento da expressão de iNOS e elevação dos níveis de NO. Esse perfil temporal indica uma transição de uma resposta inicial dependente da eNOS para uma resposta tardia mediada pela iNOS. O bloqueio do receptor TLR4 com anticorpo específico reduziu a produção de óxido nítrico (NO), e a estimulação com LPS não exerceu efeito adicional sobre essa redução, sugerindo que a resposta observada é dependente da ativação do TLR4. Nos experimentos de reatividade vascular, o LPS suprimiu o efeito anticontrátil do PVAT em aortas de camundongos C57BL/6J. Em contraste, aortas provenientes de camundongos TLR4^{-/-} não apresentaram efeito anticontrátil do PVAT em condições basais, nem exibiram alterações funcionais após o estímulo com LPS, evidenciando o papel crucial do TLR4 do PVAT na modulação do tônus vascular. A inibição não seletiva das óxido nítrico sintases com L-NAME aumentou a resposta contrátil; entretanto, esse aumento foi menos pronunciado nas aortas tratadas com L-NAME associado ao LPS, quando comparadas às aquelas tratadas apenas com L-NAME, sugerindo redução da biodisponibilidade de NO na presença do LPS e reforçando o envolvimento da via do NO na modulação da reatividade vascular. A ativação da via ERK1/2 foi identificada como um evento central na disfunção do PVAT induzida pelo agonismo agudo do receptor TLR4. O inibidor seletivo de MEK1/2, PD98059, restaurou o efeito anticontrátil do PVAT, normalizou a produção de NO e reverteu o aumento da fosforilação inibitória da eNOS no resíduo Thr495. Além disso, o LPS elevou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no endotélio e no PVAT, efeito prevenido pelo PD98059, indicando que a via ERK1/2 também contribui para o aumento do estresse oxidativo. Em conjunto, os resultados identificam o eixo TLR4–ERK1/2–eNOS como mediador crítico da disfunção do PVAT induzida pelo agonismo agudo do TLR4, oferecendo uma base mecânica para compreender como a ativação desse receptor suprime a função da eNOS, compromete a modulação anticontrátil do PVAT e prejudica a homeostase vascular.

Palavras-chave: TLR4; PVAT; eNOS; ERK1/2; LPS; óxido nítrico; reatividade vascular; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that genetic deletion of Toll-like receptor 4 (TLR4) significantly impairs vascular function. In this context, the present study aimed to investigate the modulatory role of TLR4 on the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) and its interaction with endothelial cells under physiological conditions, specifically evaluating the effects of acute TLR4 agonism induced by lipopolysaccharide (LPS). In human endothelial cells (EA.hy926), stimulation with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reduced basal nitric oxide (NO) production during the first 30 minutes, followed, after 1 hour, by increased inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and elevated NO levels. This temporal profile indicates a transition from an initial eNOS-dependent response to a late iNOS-mediated response. Blockade of the TLR4 receptor with a specific antibody reduced nitric oxide (NO) production, and LPS stimulation did not exert any additional effect on this reduction, suggesting that the observed response is dependent on TLR4 activation. In vascular reactivity experiments, LPS suppressed the anticontractile effect of PVAT in aortas from C57BL/6J mice. In contrast, aortas from TLR4^{-/-} mice exhibited no PVAT anticontractile effect under basal conditions and showed no functional alterations in response to LPS stimulation, highlighting the crucial role of PVAT TLR4 in the modulation of vascular tone. Non-selective inhibition of nitric oxide synthases with L-NAME increased contractile responses; however, this increase was less pronounced in aortas treated with L-NAME in combination with LPS compared with those treated with L-NAME alone. This finding suggests reduced NO bioavailability in the presence of LPS and further supports the involvement of the NO pathway in the modulation of vascular reactivity. Activation of the ERK1/2 pathway was identified as a central event in PVAT dysfunction induced by acute TLR4 agonism. The selective MEK1/2 inhibitor PD98059 restored the anticontractile effect of PVAT, normalized NO production, and reversed the increase in inhibitory phosphorylation of eNOS at the Thr495 residue. In addition, LPS increased the production of reactive oxygen species (ROS) in both the endothelium and PVAT, an effect prevented by PD98059, indicating that ERK1/2 signaling also contributes to enhanced oxidative stress. Taken together, these findings identify the TLR4–ERK1/2–eNOS axis as a critical mediator of PVAT dysfunction induced by acute TLR4 agonism, providing a mechanistic basis for understanding how TLR4 activation suppresses eNOS function, impairs PVAT-mediated anticontractile modulation, and compromises vascular homeostasis.

Keywords: TLR4; PVAT; eNOS; ERK1/2; LPS; nitric oxide; vascular reactivity; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Anatomia vascular aórtica.....	19
Figura 2. Representação esquemática dos efeitos vasodilatadores e vasoconstritores do PVAT e sua interação com o endotélio e músculo liso na regulação do tônus vascular	25
Figura 3. Regulação da atividade da eNOS.....	28
Figura 4. Desenho experimental do modelo celular.....	36
Figura 5. Desenho experimental do modelo animal.....	40
Figura 6. Produção de óxido nítrico (NO) em células EA.hy926.....	43
Figura 7. Expressão iNOS em células EA.hy926 estimuladas com LPS.....	43
Figura 8. Efeito do estímulo ou do bloqueio dos receptores TLR4 sobre a produção de NO em células EA.hy926, utilizando-se LPS ou anticorpos anti-TLR4, respectivamente.....	44
Figura 9. Relaxamento e contratilidade vascular em camundongos C57BL/6J e nocaute para TLR4 sem PVAT e efeito do estímulo com LPS.....	46
Figura 10. Relaxamento vascular induzido pela acetilcolina em camundongos C57BL/6J e camundongos nocaute para TLR4 (TLR4 ^{-/-}) e efeito do estímulo com LPS no relaxamento dos camundongos C57.....	47
Figura 11. Contratilidade vascular em vasos de camundongos C57BL/6J com e sem endotélio, e camundongos nocaute para TLR4 na presença e ausência do PVAT e efeito do estímulo com LPS.....	49
Figura 12. Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com o inibidor não seletivo L-NAME sobre a contratilidade em anéis de aorta torácica com PVAT de camundongos C57BL/6J, estimulados ou não com LPS.....	51
Figura 13. Efeito do bloqueio da ativação de ERK com PD98059 na contratilidade vascular em camundongos C57BL/6J com PVAT, estimulados ou não com LPS.....	52
Figura 14. Produção de NO por fluorescência no endotélio em cortes de aorta incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min com e sem PD98059	53
Figura 15. Produção de NO por fluorescência no PVAT em cortes de aorta incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min com ou sem PD98059.....	54
Figura 16. Determinação da expressão de eNOS por imunofluorescência no endotélio em cortes de aorta torácica sem PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059	55
Figura 17. Determinação da expressão de eNOS por imunofluorescência no PVAT em cortes de aorta torácica com PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059.....	56
Figura 18. Determinação da expressão de eNOS ser1177 por imunofluorescência no endotélio em cortes de aorta torácica sem PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059.....	56
Figura 19. Determinação da expressão de eNOSser1177 por imunofluorescência no PVAT em cortes de aorta torácica com PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059.....	57
Figura 20. Determinação da expressão de eNOSthr495 por imunofluorescência no endotélio em cortes de aorta torácica sem PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059.....	57
Figura 21. Determinação da expressão de eNOSthr495 por imunofluorescência no PVAT em cortes de aorta torácica com PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059.....	58

Figura 22. Ativação da ERK1/2 na aorta (A) e no PVAT (B)) Expressão da ERK1/2 fosforilada no sítio de ativação Thr177 (p-ERK1/2 ^{Thr177}) corrigido pela ERK1/2 total, por Western blot.....	60
Figura 23. Efeito do Tiron, sequestrador de ROS, na contratilidade vascular em camundongos C57BL/6J com PVAT, estimulados ou não com LPS.....	61
Figura 24. Produção de ROS (DHE) por fluorescência em cortes de aorta sem PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059.	62
Figura 25. Produção de ROS (DHE) por fluorescência no PVAT em cortes de aorta com PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059.....	63
Figura 26. Mecanismo proposto da Disfunção do PVAT induzida pela ativação aguda do receptor TLR4.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

Acrônimo	English	Português
ACh	Acetylcholine	Acetilcolina
ATP	Adenosine triphosphate	Trifosfato de adenosina
BAECs	Bovine Aortic Endothelial Cells	Células endoteliais da aorta bovina
BH ₄	Tetrahydrobiopterin	Tetraidrobiopterina
Ca ⁺²	Calcium ion	Íon cálcio
CD14	Cluster of differentiation 14	Cluster de diferenciação 14
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	Monofosfato cíclico de guanosina
DAF-FM-DA	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate	Diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns	Padrões moleculares associados a danos
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHE	Dihydroethidium	Diidroetídio
DNA	Deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
EA.hy926	Cell line produced by hybridizing human umbilical vein endothelial cells	Linhagem celular produzida pela hibridização de células endoteliais da veia umbilical humana
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK 1/2	Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2	Cinase regulada por sinal extracelular 1/2
ET-1	Endothelin - 1	Endotelina - 1
FAD	Flavin adenine dinucleotide	Dinucleotídeo de flavina adenina
FMN	Flavin Mononucleotide	Mononucleotídeo de flavina
GTP	Guanine triphosphate	Trifosfato de guanina
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	Peróxido de hidrogênio
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	Células endoteliais da veia umbilical humana
IL-1 β	Interleukin-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleukin-6	Interleucina-6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Óxido nítrico sintase induzível
IRF 3	Interferon Regulatory Factor 3	Fator regulador de interferon 3
JNK	c-Jun N-terminal kinase	cinase c-Jun N-terminal
KCL	Potassium chloride	Cloreto de potássio
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginine methyl ester	N ω --Nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolysaccharides	Lipopolissacarídeo
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases	Proteínas quinases ativadas por mitógeno

Acrônimo	English	Português
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MD2	Myeloid differentiation factor 2	Fator de diferenciação mieloide 2
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88	Gene de resposta primária à diferenciação mieloide 88
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	Fator nuclear kappa-cadeia leve intensificador de células B ativadas
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Nitric Oxide	Óxido nítrico
NOS	Nitric oxide synthase	Óxido nítrico sintase
NOX2	NADPH oxidase 2	NADPH oxidase 2
O ₂ ⁻	Superoxide ion	Íon superóxido
OCT	Optimal Cutting Temperature compound	Composto com temperatura de corte ideal
ONOO ⁻	Peroxynitrite	Peroxinitrito
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Phosphate Buffered Saline	Solução salina tamponada com fosfato
pERK	Protein Kinase R(PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase	Cinase regulada por sinal extracelular 1/2 fosforilada
PGI ₂	Prostacyclin	Prostaciclina
pH	Potential of hydrogen	Potencial de hidrogênio
PKB	Protein Kinase B	Proteína Quinase B
PKC	Protein Kinase C	Proteína Quinase C
PKG	Protein Kinase G	Proteína Quinase G
PP1/2A/2B	Protein Phosphatase 1/2A/2B	Proteína Fosfatase 1/2A/2B
PRRs	Pattern Recognition Receptors	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PVAT	Perivascular adipose tissue	Tecido adiposo perivascular
ROS	Reactive oxygen species	Espécies reativas de oxigênio

Acrônimo	English	Português
SC-293072	mouse monoclonal antibody used in cell culture to detect Toll-like receptor 4 (TLR4) in human, mouse, rat, and canine cells	Anticorpo monoclonal de camundongo usado em cultura de células para detectar o receptor Toll-like 4 (TLR4) em células humanas, de camundongo, ratos e caninas
SC-7271	Monoclonal mouse antibody that targets the NOS2 protein	Anticorpo monoclonal de camundongo que tem como alvo a proteína NOS2
Ser114/615/633/1177	Serine 114/615/633/1177	Serina 114/615/633/1177
sGC	Soluble guanylyl cyclase	Guanila ciclase solúvel
SOD	Superoxide dismutase	Superóxido dismutase
TAK-242	TLR4 Inhibitor	Inibidor de TLR4
Thr495	Threonine 495	Treonina 495
TLR4	Toll-Like Receptor 4	Receptor Toll-like 4
TLR4 ^{-/-}	Toll-Like Receptor 4 knockout	Knockout do Receptor Toll-like 4
TLRs	Toll-Like Receptors	Receptores Toll-like
TNF- α	Tumor Necrosis Factor - alpha	Fator de Necrose Tumoral - alfa
TRAM	TRIF-related adaptor molecule	Molécula adaptadora relacionada ao TRIF
TRIF	TIR-Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon- β	Interferon- β Indutor de Adaptador Contendo Domínio TIR
Tyr81/657	Tyrosine 81/657	Tirosina 81/657
VSMCs	Vascular Smooth Muscle Cells	Células Musculares Lisas Vasculares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Anatomia vascular aórtica	19
1.1.1. <i>Túnica íntima</i>	19
1.1.2. <i>Túnica média</i>	20
1.1.3. <i>Túnica adventícia</i>	20
1.1.4. <i>Tecido adiposo perivascular (PVAT)</i>	21
1.2. Endotélio vascular	21
1.3. Tecido adiposo perivascular (PVAT)	23
1.4. Receptores <i>Toll-like</i> (TLRs) e endotélio	25
1.5. Receptores <i>Toll-like</i> 4 e a Regulação da Produção de Óxido Nítrico	27
2. JUSTIFICATIVA E FORMULAÇÃO DAS HIPÓTESES	32
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
4. METODOLOGIA E MATERIAIS	35
5. RESULTADOS	42
5.1. Efeito da ativação aguda do TLR4 com LPS nas células endoteliais EA.hy926	42
CONCLUSÃO PARCIAL 1	44
5.2. Efeito da ativação aguda do TLR4 com LPS sobre a função vascular	45
CONCLUSÃO PARCIAL 2	50
CONCLUSÃO PARCIAL 3	59
CONCLUSÃO PARCIAL 4	64
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	88

1. INTRODUÇÃO

Os vasos sanguíneos constituem estruturas altamente especializadas, compostas por diferentes camadas celulares e componentes não celulares. Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio dinâmico entre os fatores biologicamente ativos produzidos pelo endotélio, pelo músculo liso vascular e pelo tecido adiposo perivascular **PVAT**, que juntos, garantem a manutenção da homeostase vascular (CHENG; DING; JIANG; YIN *et al.*, 2023).

O endotélio, particularmente, é amplamente reconhecido como um componente ativo e multifuncional do sistema cardiovascular, e sua disfunção está implicada em diversas condições patológicas, incluindo sepse, hipertensão e aterosclerose (WANG; HE, 2024). Por outro lado, o **PVAT**, anteriormente considerado um tecido estrutural inerte, é atualmente reconhecido como um órgão endócrino/parácrino ativo, que exerce efeitos anticontráteis sobre o vaso adjacente, por meio da liberação de adipocinas, citocinas, óxido nítrico (**NO**) e espécies reativas de oxigênio (**ROS**), modulando a função vascular tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (LÖHN; DUBROVSKA; LAUTERBACH; LUFT *et al.*, 2002; XIA; HORKE; HABERMEIER; CLOSS *et al.*, 2016).

A literatura é abundante no que tange a alvos moleculares para modulação do sistema vascular, como canais iônicos, enzimas e receptores, dentre outros. Receptores celulares anteriormente desconhecidos ou negligenciados tem assumido recentemente papel importante na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos vasculares. É o caso dos receptores tipo Toll ou *Toll-like receptors* (**TLRs**). Os **TLRs** constituem um dos principais componentes do sistema imune inato, atuando como sentinelas moleculares na detecção de padrões associados a patógenos (**PAMPs**) ou a dano celular (**DAMPs**). Entre esses receptores, o **TLR4** (do inglês, *Toll-like receptor 4*) destaca-se por sua ampla expressão em diferentes tipos celulares e por sua capacidade de amplificar respostas pró-inflamatórias mediante a ativação de vias de sinalização (DAUPHINEE; KARSAN, 2006; OLEJNIK; HUME; MÜHLBERGER, 2018; STARK; CHOI; KOCH; LAMB *et al.*, 2015). Embora sua participação na defesa celular contra infecções seja amplamente reconhecida, a sua ativação crônica e desregulada contribui para a patogênese de diversas doenças metabólicas e cardiovasculares (DE OLIVEIRA; NUNES, 2021; MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016). Mais especificamente, pouco se sabe sobre as vias de sinalização celular ativadas nos estágios iniciais após a ativação do TLR4. A maior parte dos trabalhos é

focada nas vias de transcrição ativadas por estes receptores principalmente na resposta inflamatória.

Evidências crescentes demonstram que o receptor **TLR4** encontra-se ativado no endotélio vascular em condições como sepse, obesidade, hipertensão e diabetes. Nesses cenários, sua ativação tem sido associada à redução da atividade da **eNOS** (óxido nítrico sintase endotelial), ao aumento da expressão de **iNOS** (óxido nítrico sintase induzível), aumento das espécies reativas de oxigênio e à indução de um fenótipo endotelial pró-inflamatório, contribuindo para a lesão vascular (QI; QU; XIONG; ROM *et al.*, 2018; SAXTON; CLARK; WITHERS; ERINGA *et al.*, 2019; STARK; KOCH; CHOI; MACE *et al.*, 2017; YAMASHITA; KAWASHIMA; OHASHI; OZAKI *et al.*, 2000; YAZJI; SODHI; LEE; GOOD *et al.*, 2013).

Entretanto, de forma paradoxal, evidências indicam que a deleção genica ou o bloqueio farmacológico do **TLR4** em condições basais pode também comprometer a função endotelial, resultando em redução do relaxamento dependente de endotélio e alteração da contratilidade vascular. (HARRINGTON; LUNDBERG; WAIGHT; ROZARIO *et al.*, 2011; NAVIA-PELAEZ; DIAS; ORELLANO; CAMPOS *et al.*, 2022). Esses efeitos parecem estar associados à menor produção de óxido nítrico decorrente da modulação de **eNOS** e **nNOS** (óxido nítrico sintase neuronal) no endotélio, ao aumento do estresse oxidativo e à alteração da atividade dos canais de cálcio (HARRINGTON; LUNDBERG; WAIGHT; ROZARIO *et al.*, 2011; NAVIA-PELAEZ; DIAS; ORELLANO; CAMPOS *et al.*, 2022). No entanto, os mecanismos exatos por meio dos quais o **TLR4** influencia a reatividade vascular (seja através de efeitos diretos sobre o endotélio, sobre o músculo liso ou sobre o **PVAT**) ainda não estão completamente elucidados.

Esses achados sugerem que, embora classicamente associado à inflamação, o **TLR4** também desempenha um papel basal na manutenção do tônus vascular e da homeostase endotelial. Nesse contexto, compreender de forma mais aprofundada o papel dual do **TLR4** na regulação da função vascular — tanto como mediador de lesão quanto como potencial modulador fisiológico da homeostase vascular — torna-se fundamental para a elucidação dos mecanismos envolvidos nas doenças cardiovasculares e para a identificação de novos alvos terapêuticos.

1.1. Anatomia vascular aórtica

Uma abordagem anatômica mais ampla nos permite entender o papel que o **TLR4** desempenha nas vias de sinalização relacionadas à função vascular. A parede vascular é composta por três camadas estruturais distintas, cada uma com funções específicas na regulação da função vascular: (i) a túnica íntima, revestida por células endoteliais que atuam como interface entre o sangue e o tecido vascular; (ii) a túnica média, composta predominantemente por células de músculo liso vascular responsáveis pela contratilidade e controle do tônus vascular; (iii) a túnica adventícia, formada por fibroblastos, matriz extracelular, vasos da vasa vasorum, fibras nervosas e células imunes residentes, como apresentado na **Figura 1. Anatomia vascular aórtica**. Túnica íntima, média e adventícia. **Figura 1**, onde se resume um esboço dos constituintes anatômicos do vaso (DALY, 2019; MA; LI; YANG; LIU *et al.*, 2023). Além dessas, o tecido adiposo perivascular (**PVAT**), circunda os vasos e exerce influência endócrina/parácrina significativa sobre as demais camadas (HILLOCK-WATLING; GOTLIEB, 2022).

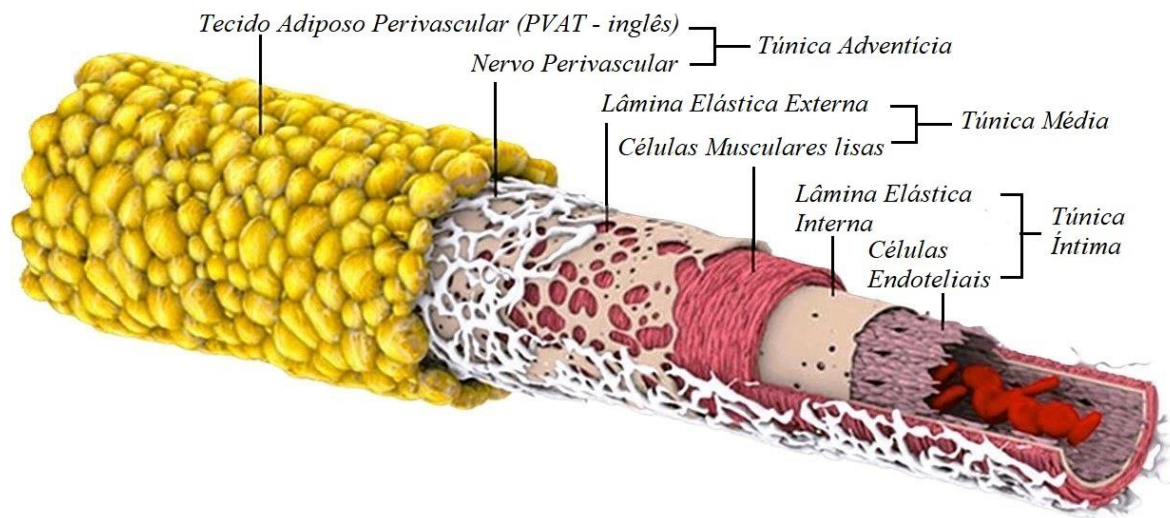


Figura 1. Anatomia vascular aórtica. Túnica íntima, média e adventícia. Adaptado de Daly, et al., 2019.

1.1.1. Túnica íntima

A camada mais interna do vaso é constituída por uma monocamada contínua de células endoteliais, apoiadas sobre uma lâmina basal de matriz extracelular. Além de atuarem como barreira semipermeável entre o sangue e o tecido subjacente, as células endoteliais possuem

funções dinâmicas essenciais na regulação do tônus vascular, da inflamação, da hemostasia e da angiogênese (FOOTE; SOARES; RAMIREZ-PEREZ; GHIARONE *et al.*, 2022). Elas sintetizam uma variedade de mediadores vasoativos, incluindo óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGL₂), endotelina-1 (ET-1) e fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF), cuja liberação depende de estímulos físico-químicos como o estresse de cisalhamento e mediadores inflamatórios. (JIN; FANG; WANG; SHAO *et al.*, 2023; SHIMOKAWA; GODO, 2016).

O endotélio também expressa receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores Toll-like (TLRs), dentre eles o receptor TLR4, que permitem o reconhecimento de sinais de perigo de origem infecciosa (PAMPs) ou endógena (DAMPs), modulando respostas inflamatórias locais e sistêmicas com impacto direto na integridade vascular (JIN; FANG; WANG; SHAO *et al.*, 2023).

1.1.2. *Túnica média*

A túnica média é composta predominantemente por células de músculo liso vascular (VSMCs), dispostas em camadas concêntricas intercaladas com fibras elásticas e colágeno. Essas células são responsáveis pela contratilidade e elasticidade do vaso, modulando o diâmetro luminal em resposta a estímulos vasoativos como catecolaminas, angiotensina II, endotelina-1 e óxido nítrico. Em condições fisiológicas, as VSMCs mantêm um fenótipo contrátil; no entanto, sob estímulos inflamatórios ou mecânicos, podem diferenciar-se para um fenótipo sintético — caracterizado por elevada capacidade proliferativa, migratória e produção de matriz extracelular — processo fundamental na aterogênese e no remodelamento vascular (CAO; XUAN; HU; ZHANG *et al.*, 2022; ZHANG; GUO; XIA; MAO, 2022).

1.1.3. *Túnica adventícia*

A camada adventícia, situada na porção mais externa do vaso, é composta por fibroblastos, colágeno tipo I, nervos simpáticos e vasos da vasa vasorum, os quais nutrem as camadas mais internas, principalmente em artérias de grande calibre. Por muito tempo considerada uma estrutura meramente estrutural, hoje se reconhece que a adventícia participa ativamente na inflamação vascular, sendo uma fonte de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (TINAJERO; GOTLIEB, 2020). Além disso, a adventícia abriga células progenitoras vasculares e imunocompetentes, como macrófagos e células dendríticas,

desempenhando papel importante na iniciação e progressão da inflamação crônica nos vasos. (LI; HONG; CHEN; LU *et al.*, 2020; STENMARK; YEAGER; EL KASMI; NOZIK-GRAYCK *et al.*, 2013)

1.1.4. Tecido adiposo perivascular (PVAT)

O PVAT circunda os vasos de médio e grande calibre, estando ausente apenas nos capilares. Originalmente considerado um tecido estrutural passivo, o PVAT é hoje reconhecido como um regulador ativo da função vascular, exercendo ações endócrinas, parácrinas e autócrinas. Em condições normais, o PVAT exerce efeito anticontrátil, contribuindo para a vasodilatação e a proteção contra a hipertensão (QI; QU; XIONG; ROM *et al.*, 2018). Essa função protetora é mediada pela liberação de fatores derivados do adipócito, como adiponectina, NO, prostaglandinas e H₂O₂ em baixas concentrações. No entanto, em estados de disfunção metabólica, como obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2, o PVAT passa a secretar mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-6, MCP-1 e ROS, que contribuem para a disfunção endotelial e o aumento da contratilidade vascular (LÖHN; DUBROVSKA; LAUTERBACH; LUFT *et al.*, 2002; XIA; HORKE; HABERMEIER; CLOSS *et al.*, 2016).

Além disso, o PVAT expressa receptores TLRs, incluindo o TLR4, cuja ativação contribui para o estado inflamatório e oxidativo que compromete a homeostase vascular. A ativação do TLR4 em células do PVAT promove a secreção de citocinas inflamatórias e o recrutamento de células imunes, intensificando a inflamação perivascular (MAWANDJI; LISBOA; GOMES; VIEIRA *et al.*, 2025; SAXTON; CLARK; WITHERS; ERINGA *et al.*, 2019).

1.2. Endotélio vascular

O endotélio vascular constitui uma interface dinâmica entre o sangue e a parede do vaso, exercendo papel central na homeostase cardiovascular. Para além de sua função como barreira semipermeável, as células endoteliais regulam o tônus vascular, a permeabilidade, a agregação plaquetária, a adesão e migração de leucócitos, além de modularem respostas inflamatórias e trombóticas (ANDRABI; SHARMA; KARAN; SHAHRIAR *et al.*, 2023).

Entre os mediadores bioativos produzidos pelas células endoteliais, destaca-se o óxido nítrico (**NO**), uma molécula gasosa com potente efeito vasodilatador e propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e antitrombóticas, sendo um potente regulador da homeostase vascular e do tônus basal dos vasos sanguíneos. O óxido nítrico (**NO**) é sintetizado de forma constitutiva pelas sintases do óxido nítrico (**NOS**), mas sua produção também pode ser estimulada por diversos agonistas, como acetilcolina, histamina, bradicinina, ácido araquidônico e nucleotídeos de adenina (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

No endotélio, as sintases do óxido nítrico (**NOS**) existem em três isoformas diferentes: duas isoformas constitutivas: endotelial (**eNOS**) e neuronal (**nNOS**), e uma isoforma induzível (**iNOS**), sendo as principais fontes de óxido nítrico (**NO**) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

A NOS neuronal (**nNOS**) é encontrada predominantemente nos sistemas nervoso e entérico, mas também no músculo liso vascular e nos miócitos cardíacos. A NOS endotelial (**eNOS**) é encontrada predominantemente no endotélio e nos miócitos cardíacos. A isoforma induzível (**iNOS**) é amplamente expressa em resposta ao estresse inflamatório, embora seja encontrada constitutivamente em baixos níveis em alguns tecidos (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; LAMBDEN, 2019). Dentre essas, a **eNOS** é a isoforma constitutiva mais relevante em células endoteliais, atuando na produção contínua e regulada de **NO** em resposta a estímulos mecânicos e químicos fisiológicos, como o cisalhamento do fluxo sanguíneo e a acetilcolina (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

As **NOS** também produzem o fator de hiperpolarização dependente do endotélio (**EDHF**), peróxido de hidrogênio (**H₂O₂**) e sob condições de depleção do cofator **BH₄** ou deficiência do substrato L-arginina, eNOS pode se desacoplar e produzir espécies reativas de oxigênio, particularmente o radical superóxido, **O₂⁻** (GARCIA; SESSA, 2019).

O **NO** é produzido a partir da L-arginina, com a participação dos cofatores **BH₄**, **NADPH**, **FAD**, **FMN** e heme. Essa molécula gasosa e lipofílica exerce um amplo espectro de funções fisiológicas, atuando como importante regulador da função vascular. O **NO** promove vasodilatação, atuando sobre a guanilil ciclase solúvel (**sGC**), que catalisa a conversão de **GTP**

em **cGMP**, levando à ativação de proteínas quinases dependentes de **cGMP** e ao relaxamento da musculatura lisa. Além disso, pela ativação ou desativação de fatores de transcrição (LAMB DEN, 2019; PAUTZ; LI; KLEINERT, 2021; WEISS; GOOSSEN; DOPPLER; FUCHS *et al.*, 1993).

A disfunção endotelial, caracterizada pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (**NO**) e por uma resposta vasodilatadora atenuada, pode resultar tanto da diminuição na produção de **NO** quanto do aumento de sua degradação por espécies reativas de oxigênio (**ROS**), está fortemente associada à gênese e à progressão de diversas doenças cardiovasculares (DROŹDŹ; DROŹDŹ; WÓJCIK, 2023; GIMBRONE JR; GARCÍA-CARDEÑA, 2016). Compreender os mecanismos regulatórios da síntese e da ação do **NO**, bem como suas interações com outras vias de sinalização celular, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas à proteção da função.

1.3. Tecido adiposo perivascular (PVAT)

O tecido adiposo perivascular (**PVAT**) envolve a maioria dos vasos sanguíneos e desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular e na fisiopatologia de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. Inicialmente considerado um compartimento de suporte estrutural, o **PVAT** é hoje reconhecido como um tecido metabolicamente ativo que modula, de forma parácrina e endócrina, diversas funções vasculares (NOSALSKI; GUZIK, 2017; SAMUEL, 2020).

Embora compartilhe características com os tecidos adiposos branco e marrom, o **PVAT** possui propriedades fenotípicas e funcionais únicas. Estudos indicam que o **PVAT** se origina de precursores celulares distintos, sugerindo uma especialização funcional relacionada à sua íntima associação com a vasculatura (QI; QU; XIONG; ROM *et al.*, 2018). Além dos adipócitos, o **PVAT** contém fibroblastos, células endoteliais capilares e diversas células imunes, como macrófagos e linfócitos T, que contribuem para sua capacidade de resposta inflamatória (KIM; SHI; WINKLER; LEE *et al.*, 2020; PAUTZ; LI; KLEINERT, 2021).

O **PVAT** libera fatores vasoativos, vasodilatadores e vasoconstritores que desencadeiam efeitos de sinalização endócrina e parácrina na parede vascular. Em condições fisiológicas, o **PVAT** exerce uma influência anticontrátil sobre a parede vascular, liberando uma variedade de fatores vasoativos, como adiponectina, óxido nítrico (**NO**), prostaglandinas e peróxido de hidrogênio (**H₂O₂**), que atuam sobre o endotélio e as células do músculo liso vascular (**VSMCs**) (LEE; LU; SU; GAO, 2009; LÖHN; DUBROVSKA; LAUTERBACH; LUFT *et al.*, 2002; XIA; HORKE; HABERMEIER; CLOSS *et al.*, 2016).

Muitas dessas adipocinas e mediadores vasodilatadores exercem seus efeitos através da ativação da **eNOS** e subsequente aumento da produção de **NO**, promovendo a ativação da guanilil ciclase solúvel (**sGC**), elevação dos níveis de **cGMP** e ativação da proteína quinase G (**PKG**). Essa cascata sinalizadora leva à abertura de canais de potássio, causando hiperpolarização e relaxamento das **VSMCs**. O **H₂O₂**, por sua vez, também pode ativar diretamente a **sGC**, reforçando os efeitos vasodilatadores do **PVAT** (PAUTZ; LI; KLEINERT, 2021; SAXTON; CLARK; WITHERS; ERINGA *et al.*, 2019). Como apresentado na **Figura 2**. Outros mediadores tais como; a resistina, a quemerina e a visfatina são vasoconstritores. A resistina inibe a fosforilação da **eNOS**, enquanto a quemerina ativa os canais de **Ca⁺²** do tipo L por meio de um mecanismo desconhecido (SAXTON; CLARK; WITHERS; ERINGA *et al.*, 2019). A visfatina desencadeia estresse oxidativo e inflamação na parede vascular (AKCABAG; BAYRAM; KUCUKCETIN; UZUN *et al.*, 2021; HOGNOGI; SIMITI, 2016).

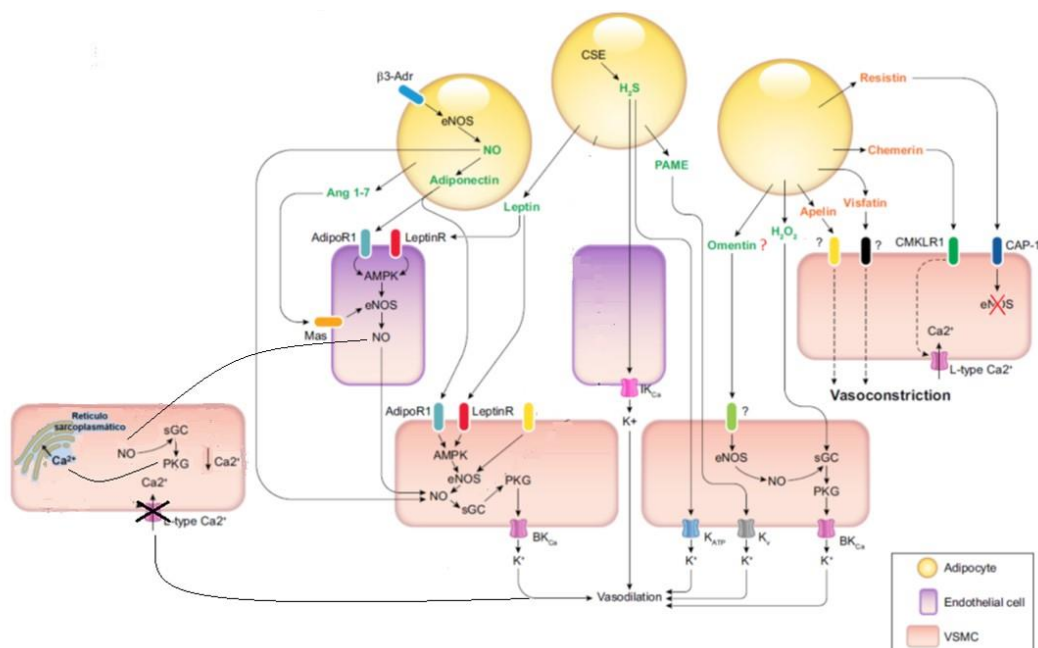


Figura 2. Representação esquemática dos efeitos vasodilatadores e vasoconstritores do PVAT e sua interação com o endotélio e músculo liso na regulação do tônus vascular. Adaptado de Saxton et al., 2019

O efeito anticontrátil do PVAT no tônus vascular é resultado da interação entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores. Contudo, em condições patológicas como obesidade e aterosclerose, o PVAT sofre remodelação estrutural e funcional, com aumento de volume, infiltração de células inflamatórias, estresse oxidativo e alteração do perfil secretor, resultando em perda de sua ação anticontrátil e amplificação da inflamação vascular (LIU; SUN; HU; LIU *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o PVAT pode produzir radicais superóxido via ativação das NADPH oxidases, aumentando a resposta contrátil por meio da ativação da via MAPK / ERK1/2. Esses efeitos contráteis do PVAT também são regulados por outras enzimas antioxidantes, incluindo SOD e catalase. Portanto, as ROS no PVAT atuam como moléculas sinalizadoras essenciais na regulação da contração do músculo liso vascular (MAN; ZHOU; XIA; LI, 2020).

Nesse cenário, o receptor Toll-like 4 (TLR4), expresso em adipócitos e células imunes do PVAT, surge como um mediador-chave da resposta inflamatória. Sua ativação por ligantes exógenos (como LPS) ou endógenos (como ácidos graxos saturados) desencadeia vias de sinalização pró-inflamatórias, como MyD88/NF- κ B e MAPKs, levando ao aumento da produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, e à disfunção da eNOS. Assim, a ativação do TLR4 no PVAT representa um elo importante entre o metabolismo, a inflamação e a disfunção vascular (RENOVATO-MARTINS; MOREIRA-NUNES; ATELLA; BARJA-FIDALGO *et al.*, 2020; SHI; KOKOEVA; INOUE; TZAMELI *et al.*, 2006).

1.4. Receptores *Toll-like* (TLRs) e endotélio

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa contra infecções e danos teciduais, reconhecendo estruturas moleculares conservadas denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Esses padrões são detectados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), entre os quais se destacam os receptores Toll-like (TLRs), uma família de proteínas transmembranares que

desempenham papel central na ativação da resposta inflamatória inata (OLEJNIK; HUME; MÜHLBERGER, 2018).

Os receptores Toll-like apresentam padrões distintos de expressão no endotélio vascular. **TLR2** e **TLR4** destacam-se por sua expressão predominante na vasculatura, enquanto **TLR7** e **TLR9** são expressos em níveis significativamente mais baixos. Já **TLR1**, **TLR3**, **TLR5**, **TLR6**, **TLR8** e **TLR10** apresentam expressão mais seletiva e variável, modulada por estímulos ambientais e condições fisiopatológicas específicas (JIN; FANG; WANG; SHAO *et al.*, 2023).

O receptor Toll-like 4 (**TLR4**), em particular, é um dos mais estudados membros dessa família e desempenha papel fundamental na ativação da resposta inflamatória diante de ligantes exógenos, como o lipopolissacarídeo (**LPS**), e endógenos, como os padrões moleculares associados a dano (**DAMPs**). A ativação do **TLR4** desencadeia vias de sinalização intracelular que culminam na expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas oxidativas, contribuindo para a inflamação vascular. Além do **LPS** e **DAMPs** celulares, o **TLR4** também pode ser ativado por ligantes estruturais diversos incluindo fragmentos de fungos, parasitas e vírus, dentre outros. Contudo, os mecanismos exatos de reconhecimento e sinalização por esses ligantes não-**LPS** permaneçam pouco compreendidos e ainda precisam ser estudados (OLEJNIK; HUME; MÜHLBERGER, 2018).

Nas células endoteliais, a ativação do **TLR4** por **LPS** envolve a formação de um complexo multiproteico com as moléculas co-receptoras **CD14** e **MD2**, essencial para o reconhecimento e internalização do estímulo. Essa ativação desencadeia duas principais vias de sinalização intracelular: a via dependente de **MyD88** (myeloid differentiation primary response gene 88) e a via independente de **MyD88**, mediada por **TRIF** (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) e **TRAM** (TRIF-related adaptor molecule) (DAUPHINEE; KARSAN, 2006; PARK; LEE, 2013; STARK; CHOI; KOCH; LAMB *et al.*, 2015).

A via dependente de **MyD88** promove a ativação precoce do fator nuclear kappa B (**NF- κ B**) e de proteínas quinases ativadas por mitógenos (**MAPKs**), incluindo **ERK1/2**, **JNK** e **p38**, culminando na expressão de genes pró-inflamatórios como **TNF- α** , **IL-1 β** e **IL-6**. Em paralelo, a via **TRIF/TRAM** gera uma resposta inflamatória de fase tardia, caracterizada pela ativação sustentada de **NF- κ B** e ativação do fator regulador do interferon 3 (**IRF3**), resultando na

produção de interferon tipo I e na amplificação da resposta inflamatória (ROMERIO; PERI, 2020). Contudo, a maioria absoluta dos estudos sobre a ativação do TLR4 pelo LPS no sistema vascular são focados na ativação das vias de transcrição genicas pro-inflamatórias. Não há estudos que demonstrem o impacto celular da ativação do TLR4 pelo LPS em situações que antecedem os eventos transcripcionais.

1.5. Receptores Toll-like 4 e a Regulação da Produção de Óxido Nítrico

A atividade óxido nítrico sintase endotelial (**eNOS**) é regulada por múltiplos mecanismos pós-traducionais, dentre os quais se destaca a fosforilação em resíduos específicos, modulada por estímulos humorais, mecânicos e farmacológicos (GARCIA; SESSA, 2019).

Até o momento, foram identificados sete sítios principais de fosforilação na **eNOS**: **Tyr81**, **Ser114**, **Thr495**, **Ser615**, **Ser633**, **Tyr657** e **Ser1177**. A fosforilação nos resíduos **Ser1177**, **Ser633**, **Tyr81** e **Ser615** está associada à ativação da enzima, enquanto as modificações nos resíduos **Ser114**, **Tyr657** e **Thr495** estão relacionadas à sua inibição. Mecanicamente, essas alterações podem interferir na ligação da calmodulina ao seu domínio específico na **eNOS**, prejudicando sua ativação (FULTON, 2016; GARCIA; SESSA, 2019; KONG; QU; LI; WANG *et al.*, 2017). Como apresentado na **Figura 3**.

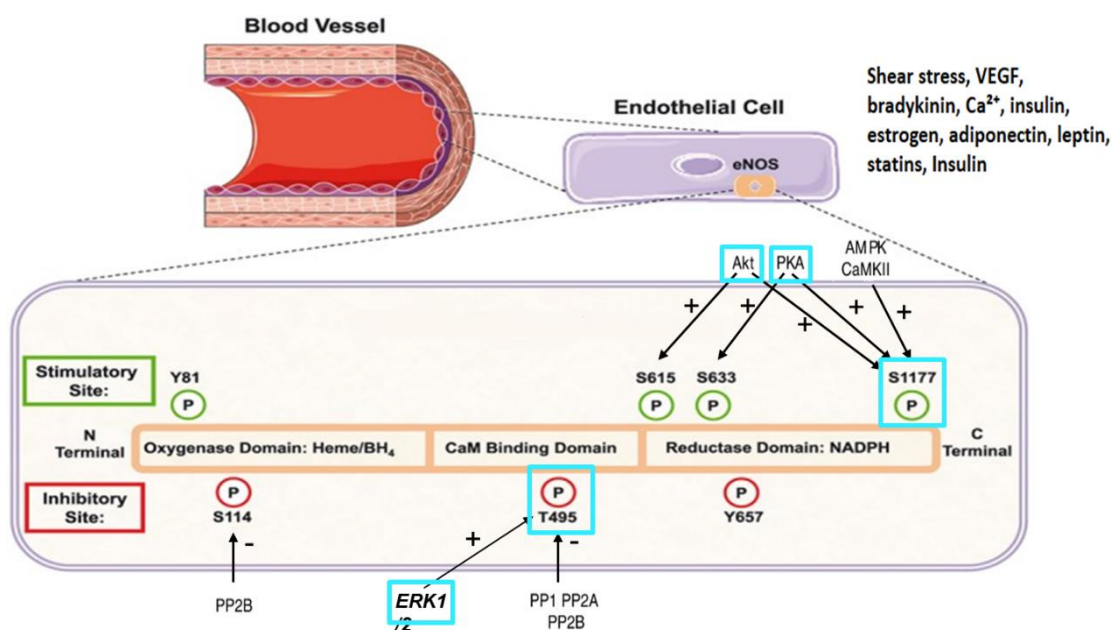


Figura 3. Regulação da atividade da eNOS. Locais de fosforilação da eNOS. A fosforilação em S1177, S615, Y81 e S633, estimula a atividade da eNOS. A fosforilação T495, Y657, S114 é considerada inibitória. As fosfatases PP1 e PP2A também regulam a atividade eNOS. Adaptado de Garcia & Sessa, 2019.

A fosforilação do resíduo **Ser1177**, localizado próximo à extremidade carboxi-terminal da **eNOS**, é fundamental para sua ativação, enquanto **Ser633** contribui para a manutenção da produção de **NO** mesmo após a retirada do estímulo inicial. Por outro lado, os resíduos **Thr495** e **Tyr657** exercem ação inibitória. Evidências indicam uma coordenação funcional entre a desfosforilação de **Thr495** e a fosforilação de **Ser1177**, sugerindo um sistema regulatório integrado. Além disso, proteínas fosfatases como **PP1**, **PP2A** e calcineurina (**PP2B**) participam da desfosforilação de **Thr495** em resposta a estímulos agonistas (MOUNT; KEMP; POWER, 2007; VANHOUTTE; ZHAO; XU; LEUNG, 2016; WANG; ZHANG; LI; GAO *et al.*, 2014).

A treonina 495 (**Thr495**) da **eNOS** apresenta-se tipicamente fosforilada em condições basais, possivelmente por ação da proteína quinase C (**PKC**). Essa fosforilação atua como mecanismo inibitório, uma vez que tende a dificultar a interação da calmodulina com o domínio específico de ligação na **eNOS**. Estímulos que promovem o aumento das concentrações intracelulares de **Ca²⁺** induzem a desfosforilação de **Thr495**, favorecendo a ligação da calmodulina e, conseqüentemente, o aumento da atividade enzimática. Evidências indicam que a desfosforilação desse resíduo resulta em maior afinidade da **eNOS** pela calmodulina. Contudo, estudos também demonstram que a remoção do fosfato de Thr495 pode, em determinados contextos, facilitar o desacoplamento da **eNOS**, contribuindo para a produção de espécies reativas de oxigênio em detrimento da síntese de óxido nítrico (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; LIN; FULTON; BABBITT; FLEMING *et al.*, 2003).

As quinases ativadas por mitógenos (**MAPKs**) — incluindo **ERK1/2**, p38 e **JNK** — representam pontos nodais nas redes de sinalização intracelular. Embora compartilhem domínios estruturais conservados, os membros da família **MAPK** diferem quanto aos estímulos ativadores, cascatas regulatórias e respostas celulares que desencadeiam. **ERK1/2**, p38 e **JNK** interagem funcionalmente com a **eNOS**, promovendo sua fosforilação e regulando a produção de **NO** de maneira dependente do contexto. Essa modulação é essencial para o controle do tônus vascular, da reatividade endotelial e da resposta inflamatória (SOLONE; CALDARA; WELLS; QIAO *et al.*, 2022).

Entre essas, a **ERK1/2** destaca-se pela capacidade de modular diretamente a atividade da **eNOS**. Estudos experimentais demonstraram que **ERK1/2** participa da fosforilação da **eNOS** por meio de um complexo multiproteico sensível à bradicinina, composto por **ERK1/2**, **AKT** ou **PKB**, **eNOS** e **Raf-1**, descrito em células endoteliais da aorta bovina (**BAECs**). Essa interação é relevante para a manutenção da produção de **NO**, cuja biodisponibilidade encontra-se frequentemente reduzida em estados patológicos como hipertensão, aterosclerose e diabetes (**BERNIER; HALDAR; MICHEL, 2000**).

A sinalização via **MAPKs** pode ser ativada por receptores Toll-like, especialmente o **TLR4**. Estudos demonstram que a superexpressão crônica de **eNOS** confere proteção contra a hipotensão induzida por lipopolissacarídeo (**LPS**) (**YAMASHITA; KAWASHIMA; OHASHI; OZAKI et al., 2000**), enquanto sua deficiência agrava as respostas inflamatórias mediadas por **TLR4**. Em células endoteliais microvasculares humanas, a redução da expressão de **eNOS** está associada ao aumento da sinalização de **TLR4** via **p38** em resposta a infecções em contextos inflamatórios crônicos (**STARK; KOCH; CHOI; MACE et al., 2017**).

Modelos de reatividade vascular mostram que a exposição ao **LPS**, tanto *ex vivo* (24 horas, 1 µg/mL) quanto *in vivo* (10–25 mg/kg), compromete a resposta vasodilatadora à acetilcolina (**ACh**), o que é atribuído à redução da biodisponibilidade de **NO**, aumento da produção de superóxido e elevação da expressão de **TLR4** e **iNOS** (**CHOY; LAU; MURUGAN; VANHOUTTE et al., 2018; GRYLLS; SEIDLER; NEIL, 2021; LIANG; LIU; WANG; XU et al., 2013; TORAL; ROMERO; JIMÉNEZ; ROBLES-VERA et al., 2016**).

Em células endoteliais, foi demonstrado que sob condições de baixo fluxo ou estresse de cisalhamento, ocorre a fosforilação da **eNOS** no resíduo **Thr495** via **ERK1/2**. Além disso, o estresse oxidativo gerado por oscilações do fluxo também é regulado por essa via (**KONG; QU; LI; WANG et al., 2017; WANG; ZHANG; LI; GAO et al., 2014**). Adicionalmente, a exposição de células endoteliais umbilicais humanas (**HUVECs**) ao **LPS** por 24 horas promoveu aumento da expressão de **TLR4**, com consequente aumento na fosforilação de **p38 MAPK** e **JNK**, expressão de **iNOS**, clivagem de caspase-3 e da subunidade **NOX2** da **NADPH** oxidase, além da redução da expressão de **eNOS** total e redução na sua **Ser1177**. Notavelmente, todos esses efeitos foram revertidos pela administração de **TAK-242**, um antagonista de **TLR4** (**CHOY; LAU; MURUGAN; VANHOUTTE et al., 2018**). Apesar de tantos efeitos endoteliais

evidenciados pela ativação do TLR4 pelo LPS, não há dados que demonstrem, por exemplo, se o LPS leva, a curto prazo, a ativação das MAPK e possível redução da atividade da eNOS. Estes dados poderiam elucidar se um possível desacoplamento da eNOS ocorreria em etapas que precedem a resposta inflamatória vascular induzida pelo LPS, ou pela ativação do TLR4 independente de LPS em condições patológicas.

No contexto do diabetes, por exemplo, TLR4 também desempenha papel relevante. Em células endoteliais humanas, a exposição à alta concentração de glicose ativa o TLR4, levando à produção de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio (ROS) (PAHWA; NALLASAMY; JIALAL, 2016). O aumento do estresse oxidativo resultante interfere nos principais mecanismos de sinalização vascular, acelerando a progressão do diabetes e aumentando o risco de doenças cardiovasculares (DE OLIVEIRA; NUNES, 2021). A modulação da atividade da NADPH oxidase, uma das principais fontes de ROS em vasos, é um dos mecanismos pelos quais o TLR4 contribui para a disfunção endotelial. Em modelos de ratos diabéticos tipo 1, a inibição aguda do TLR4 reduziu a geração de superóxido em aortas isoladas e melhorou a função vascular (DE OLIVEIRA; FAUSTINO; WEBB; NUNES, 2020)

A expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é fortemente aumentada em várias condições patológicas, especialmente na sepse, em resposta à ativação do TLR4 pelo LPS bacteriano. Diferentemente da eNOS, que é constitutivamente expressa e cuja atividade depende de cálcio, a iNOS é regulada por sinais pró-inflamatórios e promove a produção de grandes quantidades de óxido nítrico (NO) de forma sustentada e independente do influxo de cálcio (LAMB DEN, 2019). A superprodução de NO pela iNOS tem efeitos ambíguos na sepse. Por um lado, o NO tem propriedades antimicrobianas, participando da defesa inata; por outro, sua produção exacerbada contribui para a vasodilatação sistêmica, hipotensão refratária e choque séptico, além de interagir com espécies reativas de oxigênio, formando peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente citotóxico que provoca nitratação proteica, dano ao DNA e disfunção mitocondrial, comprometendo a produção de ATP e promovendo morte celular (apoptose/necrose) (HU; SHEEJA PRABHAKARAN; ZHANG; LUO *et al.*, 2024; WORKMAN; CAREY; KOHANSKI; KENNEDY *et al.*, 2017).

Estudos experimentais demonstram que a deleção genética ou a inibição seletiva da iNOS pode atenuar a hipotensão e reduzir a mortalidade em modelos animais de sepse, embora

em humanos os resultados sejam menos consistentes, sugerindo que o NO derivado da iNOS pode ter efeitos protetores ou deletérios, dependendo do estágio da sepse e do órgão afetado (LAMB DEN, 2019).

Além disso, a ativação persistente do TLR4 favorece a manutenção de um estado inflamatório crônico e pró-oxidativo, contribuindo para a disfunção endotelial, coagulopatia e imunossupressão tardia observadas na sepse. Assim, tanto o TLR4 quanto a iNOS representam alvos moleculares relevantes na tentativa de modular a resposta imune exagerada da sepse sem comprometer a defesa do hospedeiro (WANG; FENG; ZHOU; WANG, 2023).

Apesar das expectativas iniciais, os inibidores de TLR4 demonstraram eficácia limitada no tratamento da sepse, e seus benefícios clínicos permanecem incertos. Esses achados sugerem que vias alternativas, independentes do TLR4, podem desempenhar papel mais determinante na endotoxemia e no choque séptico induzidos por LPS (WANG; FENG; ZHOU; WANG, 2023).

No entanto, o papel do TLR4 na homeostase vascular ainda é objeto de debate. Harrington et al. observaram que camundongos TLR4^{-/-} apresentavam redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio e aumento dos níveis de superóxido em artérias mesentéricas estimuladas com ACh (HARRINGTON; LUNDBERG; WAIGHT; ROZARIO *et al.*, 2011). De forma consistente, dados do nosso grupo mostraram que a deleção do TLR4 prejudicou a vasodilatação induzida por ACh na aorta e reduziu a contratilidade induzida por fenilefrina, efeito relacionado à inibição da eNOS e da nNOS e consequente redução da disponibilidade de NO (NAVIA-PELAEZ; DIAS; ORELLANO; CAMPOS *et al.*, 2022). Com tudo, Liang et al. demonstraram que a resposta vasodilatadora à ACh estava significativamente reduzida em aortas e artérias mesentéricas de camundongos C3H/HeO_uJ (WT) submetidos à dieta hiperlipídica, mas foi preservada nos animais TLR4^{-/-}, sugerindo que a ausência do receptor confere proteção contra os efeitos deletérios da obesidade sobre a função endotelial (LIANG; LIU; WANG; XU *et al.*, 2013). Esses resultados sugerem que, em determinados contextos, o TLR4 pode exercer efeitos protetores na regulação rápida do tônus vascular.

2. JUSTIFICATIVA E FORMULAÇÃO DAS HIPÓTESES

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a deleção genica de **TLR4** compromete de forma significativa a função vascular. Anéis aórticos com endotélio intacto de camundongos **TLR4**^{-/-} apresentam menor contração induzida por fenilefrina em comparação aos controles. No entanto, em vasos desprovidos de endotélio funcional, não foram observadas diferenças no perfil contrátil entre os grupos, indicando que esse efeito depende da integridade endotelial. Além disso, a amitriptilina — amplamente utilizada como antagonista de **TLR4** — também reduziu a contração induzida por fenilefrina na aorta de ambos os genótipos, provavelmente por diminuir o influxo de cálcio. A vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina foi significativamente atenuada na aorta de camundongos **TLR4**, em concordância com os achados de Harrington *et al.*, que relataram respostas vasodilatadoras reduzidas à acetilcolina nesse mesmo modelo (HARRINGTON; LUNDBERG; WAIGHT; ROZARIO *et al.*, 2011). Em conjunto, esses resultados sustentam a hipótese de que o **TLR4** desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase vascular.

Além disso, não existem dados sobre o papel não-imunológico do **TLR4** no **PVAT** e as implicações no controle do tônus vascular. É necessário também que se entendam quais os mecanismos mais genéricos envolvidos na resposta vascular ao agonismo agudo do receptor **TLR4**. O entendimento de como se dá o possível crosstalk entre o receptor **TLR4** e as **NOS** constitutivas frente ao agonismo agudo do **TLR4** com o **LPS**, pode ajudar a elucidar os mecanismos de interação entre as vias fisiológicas de manutenção da homeostase vascular e as vias inflamatórias que levam a disfunção endotelial, formação de placa aterosclerótica e remodelamento vascular.

Hipóteses

- i. O **TLR4** nas células endoteliais e no **PVAT** modula a função vascular por meio da modulação da síntese e/ou biodisponibilidade do **NO**.
- ii. O **TLR4** no **PVAT** é essencial para a manutenção do seu efeito anticontrátil em condições fisiológicas, através da regulação da produção de **NO**.

- iii. A ativação aguda do TLR4 com o LPS (30 minutos) leva a ativação da via ERK1/2, fosforilação do sítio inibitório Thr495 da eNOS e consequente redução da biodisponibilidade de NO.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo do projeto é identificar o papel modulatório dos receptores TLR4 sobre o efeito anticontrátil do PVAT e sua relação com as células endoteliais em condições fisiológicas.

3.2. Objetivos específicos

- Nas células endoteliais, avaliar como a ativação aguda do TLR4 com LPS modula a produção de NO.
- Avaliar o papel do agonismo agudo do TLR4 com LPS sobre a contração e o relaxamento vascular;
- Avaliar o papel do TLR4 sobre a fosforilação da eNOS em resíduos de Thr495 e Ser1177 e, consequentemente, sobre os níveis de NO;
- Avaliar se o agonismo do TLR4 com o LPS leva a ativação rápida da ERK1/2 e consequente aumento na produção de radicais superóxido;
- Avaliar se o estresse oxidativo causado pela ativação do TLR4 pelo LPS pode ser prevenido pelo bloqueio da via da ERK1/2;
- Avaliar a contribuição relativa do TLR4 no PVAT sobre o efeito anticontrátil do mesmo, particularmente sobre o eixo ERK1/2-eNOS.

4. METODOLOGIA E MATERIAIS

4.1. Modelo celular: Cultura de células endoteliais humanas EA.hy926

Foi utilizada a linhagem de células endoteliais humanas [EA.hy926](#) (derivadas das células primárias [HUVEC](#) – Human Umbilical Vein Endothelial Cells) comercialmente disponível na ATCC, USA.

4.1.1. Medida da produção de NO e expressão de iNOS por citometria de fluxo

As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/poço e incubadas por 40 minutos a 37°C com a sonda intracelular fluorescente [DAF-FM](#) (4-Amino-5-methylamino-20, 70-difluorofluorescein, 5µM; Invitrogen, USA) para a detecção de [NO](#) sob os diferentes estímulos. Após a marcação as células foram incubadas ou não com 1 µg/ml de LPS por 10, 20, 30 minutos ou 1 hora estimuladas ou não com acetilcolina ([ACh](#)) 1mM por 1 minuto. Após incubação as células foram centrifugadas a 3000rpm por 5 minutos, lavadas com [PBS](#) 1x e fixadas com 200 µL de paraformaldeído a 2% em [PBS](#) 1x (pH 7.4).

Para detecção de [iNOS](#) após o estímulo ou não com 1 µg/ml de LPS por 10, 20, 30 minutos ou 1 hora, as células foram lavadas com [PBS](#) 1x e fixadas com 200 µL de paraformaldeído a 2% em [PBS](#) 1x. Posteriormente as células foram lavadas com [PBS](#) 1x, permeabilizadas e bloqueadas com tampão de bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA 1% em [PBS](#)) durante 10 minutos, seguido da centrifugação e incubação com anticorpo primário anti-[iNOS](#) (monoclonal produzido em camundongo, [Sc-7271](#); Santa Cruz Biotechnology, diluído 1:100) por 4 horas à temperatura a 4°C e anticorpo secundário anti-camundongo (CFL 647, SC362286; diluído 1:200) (Santa Cruz Biotecnologia, USA) por 2 horas. Para experimentos com anticorpo anti-[TLR4](#) (monoclonal produzido em camundongo, [Sc-293072](#); Santa Cruz Biotechnology; diluído 1:100) as células foram pré-incubadas com o anticorpo por 30 minutos antes da realização do estímulo com [LPS](#) 1 µg/ml por 20, 30 minutos ou 1 hora e posterior incubação com anticorpo secundário anti-camundongo (CFL 647, SC362286; diluído 1:200) por 2 horas.

A leitura de experimentos independentes cada um com 10.000 eventos, foi realizada no citômetro FACScan e FACScalibur (BD Biosciences) os resultados foram analisados pelo software FlowJO, one-way ANOVA seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. O resultado foi expresso como fluorescência média \pm EPM.

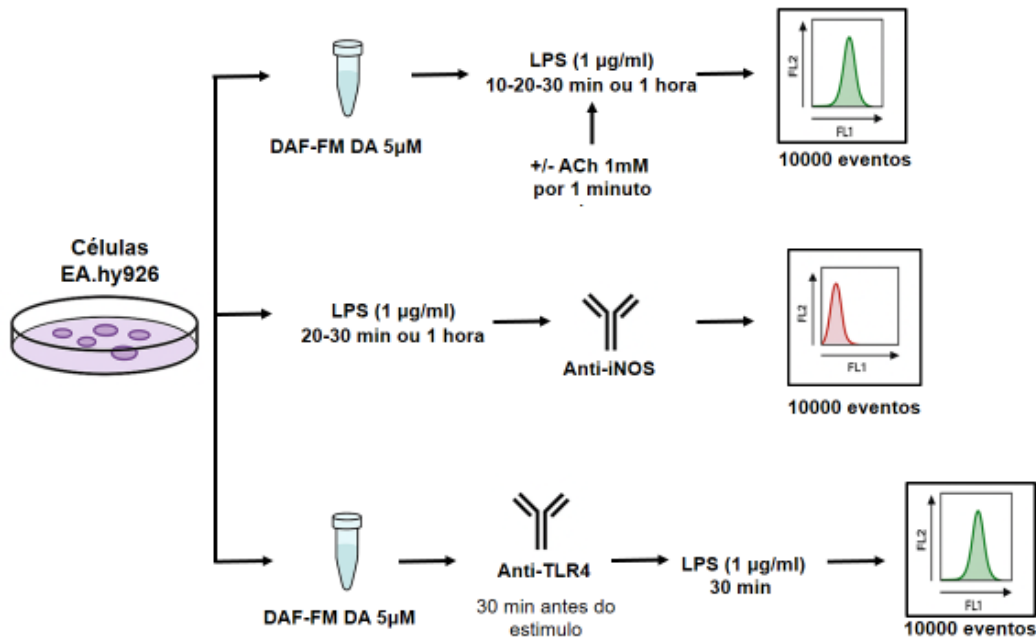


Figura 4. Desenho experimental do modelo celular. Figura criada com BioRender.com.

4.2. Modelo animal e tratamento.

Foram utilizados camundongos machos com 13 a 15 semanas de vida, da linhagem C57BL/6J, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da linhagem com deleção gênica para o receptor TLR4 (TLR4^{-/-}), provenientes do Biotério de Criação Ênio Cardillo Vieira do ICB-UFMG.

Os animais de experimentação foram mantidos no Biotério de experimentação Ênio Cardillo Vieira do ICB-UFMG, com livre acesso à ração e água, em ambiente controlado com ciclos de luminosidade de 12 horas e com temperatura controlada a $23 \pm 2,0$ °C. Foi administrada aos animais ração comercial para roedores NUVILAB®.

Nos diferentes experimentos, foram usadas preparações de aorta torácica das linhagens C57BL/6J e/ou *TLR4^{-/-}*, com e sem *PVAT*, incubadas ou não com 1µg/ml de *LPS* por 30 minutos e com inibidores farmacológicos.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da UFMG sob protocolo CEUA número 311/2022 (Anexo1).

4.2.1. *Coleta de tecidos.*

As aortas torácicas foram cuidadosamente dissecadas e imediatamente transferidas para placas de Petri contendo solução de Krebs–Henseleit (composição em mM: NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,07; CaCl₂ 2,49; NaH₂PO₄ 2,33; e glicose 11,51), ajustada para pH 7,4. Posteriormente foram incubadas com 1µg/ml de *LPS* + veículo (solução de Krebs) ou somente veículo por 30 minutos. Ao término dos tratamentos, as aortas torácicas contendo ou não *PVAT* e o *PVAT* isolado foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido para experimentos de expressão gênica e proteica ou incluídos em meio de congelamento de tecidos O.C.T (Tissue-Tek *OCT* Compound; Sakura®, USA) para posterior corte no criostato e realização de experimentos de microscopia. Aortas de alguns animais foram cuidadosamente dissecadas e utilizadas nos experimentos de reatividade vascular descritos a seguir.

4.2.2. *Reatividade vascular sistema de banho de órgãos isolados.*

A reatividade vascular da aorta torácica foi avaliada em sistema de banho de órgãos isolados (KUZMICH; SIVAK; CHUBAREV; POROZOV *et al.*, 2017). Avaliando as respostas contráteis e relaxantes a agonistas como fenilefrina e acetilcolina na presença ou ausência de endotélio em vasos coletados com ou sem *PVAT*. A montagem da aorta é feita conforme anteriormente descrito pelo nosso grupo (CAPETTINI; CORTES; LEMOS, 2010).

Os animais foram sacrificados por decapitação, em seguida, o tecido adiposo perivascular foi cuidadosamente removido sob lupa estereoscópica ou mantido, preservando a integridade do endotélio e em seguida, a aorta torácica foi cuidadosamente dissecada. As aortas

torácicas com ou sem PVAT foram imediatamente transferidas para placas de Petri contendo solução de Krebs–Henseleit (descrita acima). Posteriormente, foram cortadas em anéis de aproximadamente 2- 3 mm de comprimento e montadas em um sistema de banho de órgãos isolados, contendo solução de Krebs–Henseleit mantida a 37 °C e continuamente gaseificada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂) para garantir adequada oxigenação e manutenção do equilíbrio ácido-base. Cada anel foi suspenso entre dois ganchos metálicos, sendo um fixo e o outro conectado a um transdutor de força isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados (World Precision Instruments, Inc., USA). Após montagem, os anéis foram submetidos a uma tensão basal de 0,5 g e deixados em período de equilíbrio por 60 min, com trocas de solução a cada 15 min para estabilização da resposta mecânica.

Após o período de estabilização, a viabilidade contrátil dos anéis foi avaliada por meio da contração induzida com cloreto de potássio (KCl, 90 mM). Em seguida, os anéis foram lavados e deixados, com trocas periódicas da solução de Krebs–Henseleit. A integridade funcional do endotélio foi verificada pela adição de acetilcolina (ACh, 10⁻⁵ mol/L) em anéis previamente contraídos com fenilefrina 10⁻⁷mol/L. Considerou-se endotélio funcionalmente íntegro quando a resposta de relaxamento à ACh foi igual ou superior a 80% da contração máxima induzida pela fenilefrina e sem endotélio funcional quando a resposta à ACh foi menor de <5%.

Curvas de contração com KCL 90 mM, curvas de concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (10⁻⁹ a 10⁻⁴ mol/L) e curvas concentração-resposta cumulativas em resposta à fenilefrina (10⁻⁹ a 10⁻⁴ mol/L) contendo ou não endotélio funcional (<5%) foram construídas e comparadas nas diferentes situações experimentais. Em um conjunto de experimentos, os tecidos foram incubados ou não com LPS, 1 µg/mL por 30 minutos. Em grupos adicionais, avaliou-se a participação de vias específicas de sinalização por meio da incubação com inibidores farmacológicos, a participação do NO, do radical superóxido e ERK1/2 na função vascular, são analisadas em experimentos realizados na presença de L-NAME (inibidor não seletivo das NOS, 300µM), TIRON (scavenger de superóxido 1 mM) e PD98059 (inibidor potente e seletivo da quinase ativadora da MAP quinase (MEK) 10 µM) respectivamente, em preparações incubadas ou não com 1µg/ml de LPS.

4.2.3. Microscopia de fluorescência.

Para os experimentos de microscopia de fluorescência, os segmentos das aortas contendo ou não PVAT e tratados ou não com LPS, foram embebidos em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura®, USA), congelados em nitrogênio líquido e posteriormente cortados a 8µm em criostato. As lâminas contendo os cortes de aortas foram incubadas com sonda fluorescente intracelular para o NO (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, DAF-FM, 5µmol/L; Invitrogen, USA), ou para ROS ((di-hidroetídio), DHE, 5µmol/L; Invitrogen, USA) em PBS por 30 minutos no escuro e lavados duas vezes com PBS. Após a incubação, as lâminas foram montadas usando meio de montagem com DAPI - Prolong gold mounting media (Invitrogen, USA) para visualização dos núcleos.

Foram avaliadas também as expressões das isoformas da eNOS total, eNOS fosforilada em seus sítios de ativação (eNOSser1177) ou inativação (eNOSthr495) no endotélio e no PVAT, pelo método de imunofluorescência. As lâminas das aortas foram fixadas com acetona gelada, lavadas duas vezes com PBS, permeabilizadas e bloqueadas com tampão de bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA 1% em PBS) durante 1 hora, seguido da incubação com os anticorpos primários anti-eNOS (1:100; SC654; Santa Cruz Biotecnologia, USA), anti-eNOS ser1177 (1:100; SC12972; Santa Cruz Biotecnologia, USA) e anti-eNOSthr495 (1:100; SC19827; Santa Cruz Biotecnologia, USA) por 12 horas a 4°C. Em seguida foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-camundongo CFL 647, SC362286 (1:200; Santa Cruz Biotecnologia, USA) e com anticorpo secundário anti-coelho CFL488, SC362260 (1:200) por 2 horas à temperatura ambiente. As aquisições das imagens foram realizadas em microscópio Nikon Eclipse Ti, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do ICB-UFMG.

4.2.4. Western-blot:

Os experimentos de Western blot foram realizados com o objetivo de confirmar a expressão proteica de ERK1/2 e pERK, proteínas da via de ativação do receptor TLR4, envolvidas na regulação da fosforilação da eNOS. Para tal, foram utilizados extratos proteicos de aorta torácica (células endoteliais, músculo liso) e do PVAT isolado, as amostras foram aplicadas em uma proporção de 30 µg de proteína em gel de SDS-PAGE (Sodium dodecyl

sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) a 10%. Após serem separadas no gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore®, USA) com poro de 0,45 μm . A qualidade da transferência foi monitorada através da coloração da membrana com solução de Ponceau 0,3%. A membrana foi então lavada em água destilada e colocada por 1 hora em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1% mais 3% de albumina). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com o anticorpo primário específico ERK1/2 (monoclonal produzido em camundongo, Sc-135900, Santa cruz Biotecnologia, USA) ou pERK1/2 (policlonal produzido em coelho, Sc-16981-R, Santa Cruz Biotecnologia, USA), seguido de incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) por 2 h à temperatura ambiente. As bandas proteicas foram detectadas por uma reação quimioluminescente (Luminata™ Forte Western HRP Substrate, Millipore, MA, EUA) seguida de análises densitométricas com o software ImageJ 1.46r (Wayne Rasband, NIH, EUA).

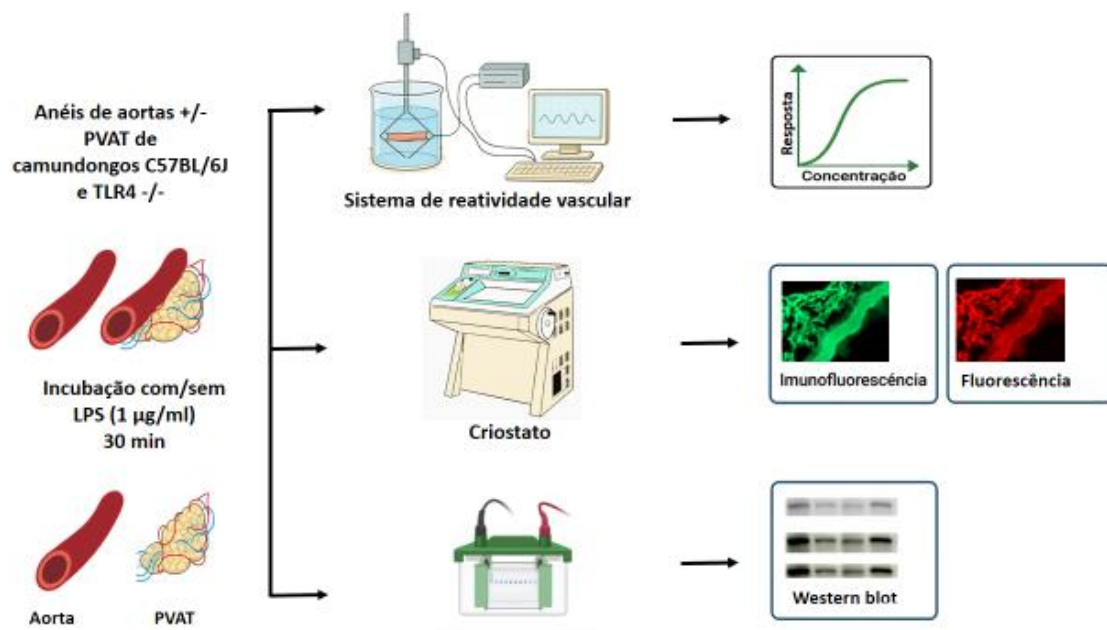


Figura 5. Desenho experimental do modelo animal. Figura criada com BioRender.com. e iStock.

4.2.5. Análise estatística.

Realizada utilizando-se o programa Graph Pad Prism 9.0. Os dados obtidos resultados são expressos como média \pm EPM em gráficos de barras e comparados pelos testes t de *Student*

ou pelo método one-way ANOVA, seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey e Šídák's. Assumiu-se a significância quando $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,0001$.

Os resultados de relaxamento vascular à acetilcolina foram expressas como porcentagem da redução da contração prévia induzida por fenilefrina. Os dados de contração, por sua vez, foram expressos em mN/mm, considerando a força desenvolvida pelo vaso e o comprimento do anel. Os valores de pD₂ ($-\log EC_{50}$), representando a concentração da droga que produziu 50% da resposta máxima da contração ou do relaxamento e os valores do E_{max}, representando a resposta máxima de relaxamento ou contração, foram determinados através de regressão não linear das curvas obtidas nos experimentos, expressos como média \pm erro padrão médio (EPM) e a diferença entre as médias foi realizada utilizando-se o método one-way ANOVA, seguido de pós-teste de comparações múltiplas de Tukey.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da ativação aguda do TLR4 com LPS nas células endoteliais EA.hy926

Como o objetivo do trabalho é avaliar as ações pré-transcricionais da ativação do **TLR4** sobre a função vascular, foi necessário determinar-se o tempo no qual o estímulo com **LPS** (1µg/mL) iniciaria a ativação da **eNOS** e a transcrição gênica da **iNOS** e, conseqüentemente, mudaria a produção basal ou estimulada de **NO**. Nossos dados com culturas de células endoteliais **EAhy926** mostram que o estímulo com **LPS** (agonista de **TLR4**) reduz a produção basal de **NO** por até 30 minutos de incubação (**Figura 6A**). Contudo, os níveis basais de **NO** aumentam significativamente após 1h de tratamento com **LPS** (**Figura 6A**). O estímulo com **ACh**, conhecida por ativar aumento de Ca^{2+} e a produção de **NO** endotelial via ativação das **NOS** constitutivas, aumenta a produção de **NO** em células controle (**Figura 6B**). Contudo, não há aumento na produção de **NO** após estímulo prévio com **LPS**. Estes dados sugerem que por até 30 minutos, há uma redução na atividade das **NOS** constitutivas e sugere que, após 1h, começa haver aumento na produção basal de **NO** via ativação da expressão da **iNOS**. Para se confirmar esta hipótese, foi feita a análise da expressão da **iNOS** por citometria de fluxo (**Figura 7**). De fato, foi observado que só existe aumento da expressão da **iNOS** após 1h de estímulo com **LPS**. Por esta razão, como nosso objetivo era avaliar os efeitos pre-transcricionais da ativação do **TLR4**, optamos por trabalhar com 30 minutos de estímulo com **LPS**.

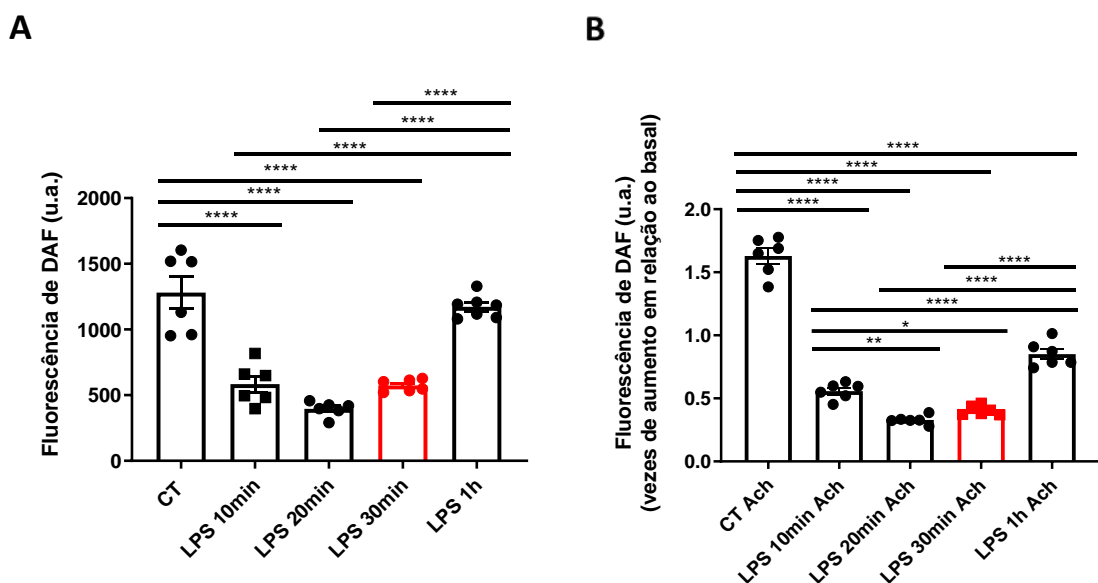


Figura 6. Produção de óxido nítrico (NO) em células EA.hy926: **A.** Detecção de NO (DAF FM) por em células endoteliais na presença ou ausência de 1 µg/ml LPS por 10, 20, 30 minutos ou 1 hora. **B.** Detecção de NO (DAF FM) (vezes de aumento em relação ao basal) em células endoteliais na presença ou ausência de 1 µg/ml LPS + acetilcolina (ACh) por 10, 20, 30 minutos ou 1 hora. Os resultados são expressos em média ± DP (N=5-6; experimentos independentes cada um com 10.000 eventos, os resultados foram analisados pelo software FlowJO, seguido de análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05, quando comparados).

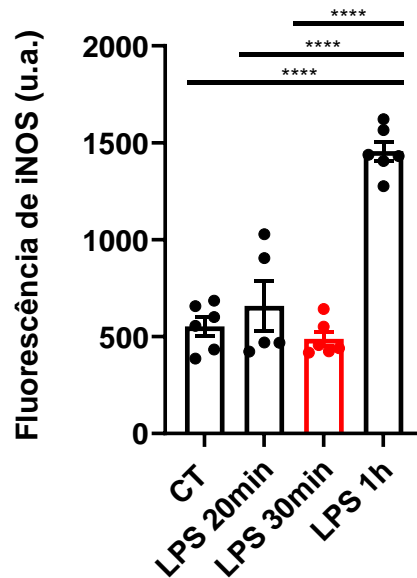


Figura 7. Expressão iNOS em células EA.hy926 estimuladas com LPS: Detecção de iNOS por citometria de fluxo em células endoteliais na presença ou ausência de 1 µg/ml LPS por 20,30 minutos ou 1 hora. Os resultados foram expressos em média ± DP (N=5-6; experimentos independentes cada um com 10.000 eventos, os resultados foram analisados pelo software FlowJO, seguido de análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05, quando comparados).

O próximo passo foi verificar se as ações do LPS se deviam especificamente ou seletivamente a ativação do receptor TLR4. Para tal, utilizamos uma estratégia de bloqueio do receptor pelo uso de anticorpo monoclonal anti-TLR4. Como observado anteriormente, o estímulo com LPS reduz a produção de NO (**Figura 8**). Contudo, somente o bloqueio do receptor com o anticorpo também reduz a produção de NO e o LPS não tem nenhum efeito aditivo sobre tal redução. Estes dados sugerem que o LPS atua seletivamente em receptores TLR4 em células endoteliais.

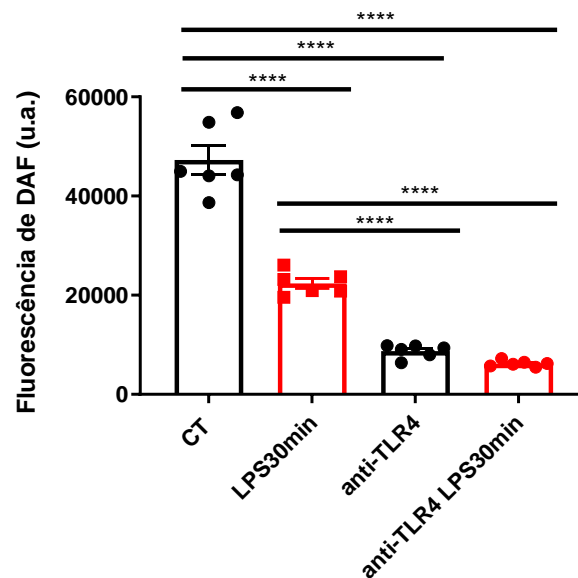


Figura 8. Efeito do estímulo ou do bloqueio dos receptores TLR4 sobre a produção de NO em células EA.hy926, utilizando-se LPS ou anticorpos anti-TLR4, respectivamente: Detecção de NO (DAF FM) por citometria de fluxo em células endoteliais na presença ou ausência de 1 µg/ml LPS para 30 minutos e pré-incubadas com anticorpo anti-TLR4 para bloquear de forma seletiva o receptor. Os resultados são expressos em média ± DP (N=5-6; experimentos independentes cada um com 10.000 eventos, os resultados foram analisados pelo software FlowJO, seguido de análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p < 0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05, quando comparados).

CONCLUSÃO PARCIAL 1

O estímulo com LPS reduz a produção basal de NO até 30 minutos de incubação e aumenta depois de 1 hora, concomitante ao aumento da expressão de iNOS.

A produção basal de NO diminui pelo bloqueio do receptor TLR4 com o anticorpo anti-TLR4.

O bloqueio do receptor TLR4 com anticorpo específico reduziu a produção de óxido nítrico (NO), e a estimulação com LPS não promoveu efeito adicional.

5.2. Efeito da ativação aguda do TLR4 com LPS sobre a função vascular

Os dados de cultura endotelial sugeriram que a ativação do TLR4 induz agudamente uma disfunção endotelial caracterizada por redução na biodisponibilidade de NO. Nosso próximo passo foi avaliar a reatividade vascular em modelo de órgãos isolados. O tratamento com LPS não modificou o perfil de relaxamento induzido pela ACh (**Figura 9A**) ou de contração induzida pela Fen (**Figura 9C**) em vasos sem PVAT. Contudo, a literatura sugere importante participação do TLR4 no controle do tônus vascular. Ao se utilizar animais TLR4 KO, observamos que a deleção gênica do TLR4 não modificou a resposta vasodilatadora à ACh (**Figura 9E**) mas reduziu a resposta contrátil à Fen (**Figura 9G**). Além disso, verificamos nos nossos dados iniciais com células endoteliais que a ativação do TLR4 com LPS reduz a biodisponibilidade de NO. A disparidade dos dados com cultura de células endoteliais e as preparações *ex vivo* nos levaram a questionar se algum outro fator poderia interferir na resposta vascular levando a um padrão diferente do que acontece com as células isoladas. Optamos por investigar os papéis do PVAT nesta diferença.

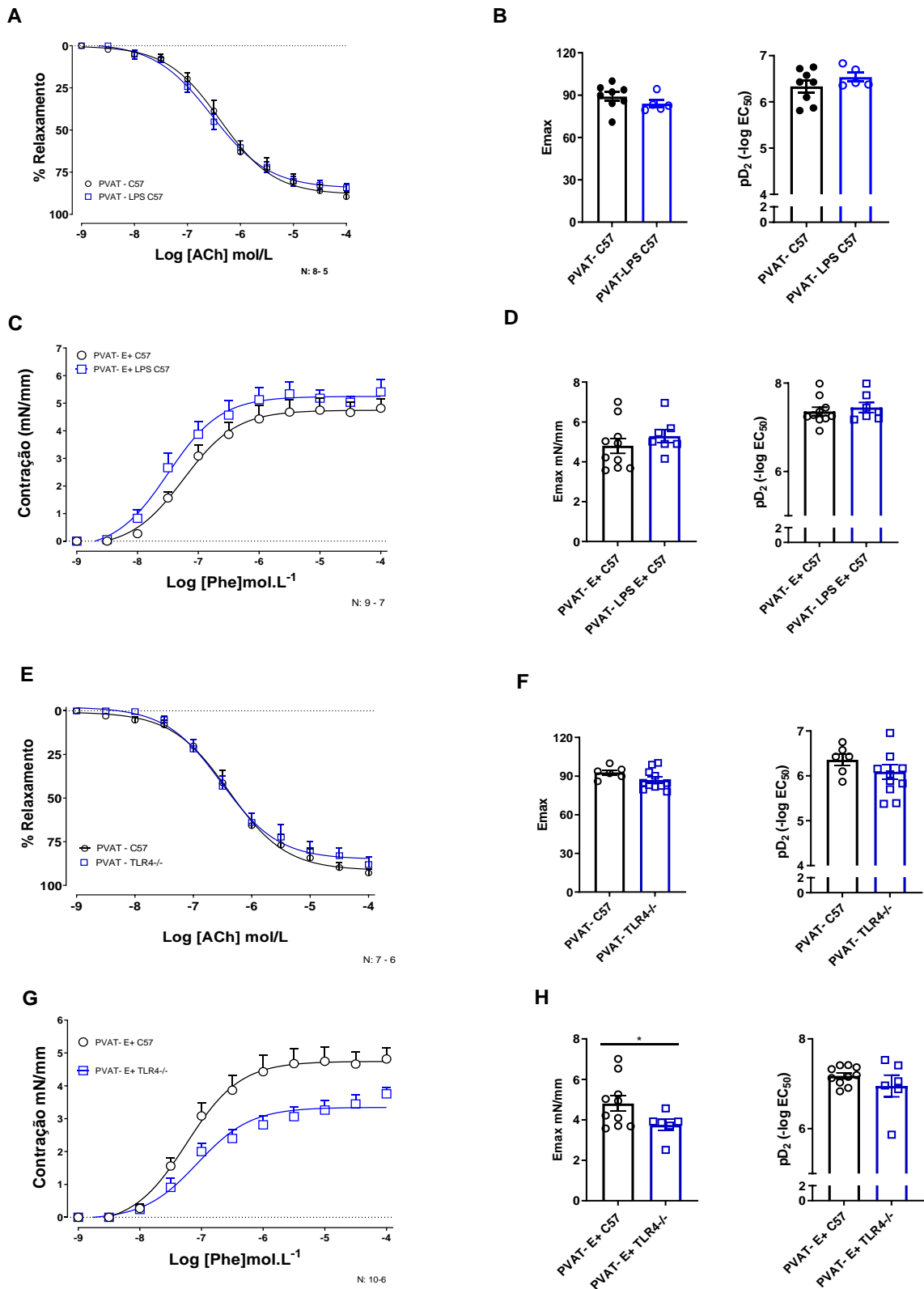


Figura 9. Relaxamento e contratilidade vascular em camundongos C57BL/6J e nocaute para TLR4 sem PVAT e efeito do estímulo com LPS. A. Curvas de resposta vasodilatadora a ACh (10⁻⁹-10⁻⁴mol / L) em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J sem PVAT (PVAT-) incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min. **C.** Curvas de concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J sem PVAT (PVAT-) incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min.

E. Curvas de resposta vasodilatadora a ACh (10^{-9} - 10^{-4} mol / L) em anéis de aorta de camundongos TLR4^{-/-} e C57BL/6 sem PVAT (PVAT⁻). **F.** As barras representam média \pm erro padrão; dos valores de Emax e pD₂ do relaxamento induzido pela Ach obtidas em preparações independentes. **G.** Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos TLR4^{-/-} e C57BL/6J sem PVAT (PVAT⁻). **B e F.** As barras representam média \pm erro padrão; dos valores de Emax e pD₂ do relaxamento induzido pela Ach obtidas em preparações independentes. **D e H.** As barras representam média \pm erro padrão; dos valores de Emax e pD₂ da contratilidade induzida pela Fen obtidas em preparações independentes. Os valores representam a média \pm EPM obtida em diferentes preparações (n=6-10). As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA a um fator). * Representa diferença significativa quando comparados (**** p < 0,0001, *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05).

A presença do PVAT não altera o padrão de relaxamento nos animais C57 (**Figura 10A e 10B**). O tratamento com LPS também não modifica o relaxamento (**Figura 10A e 10B**). Contudo, surpreendentemente, as preparações de aorta dos animais com deleção gênica para o TLR4 apresentaram piora significativa do relaxamento induzido pela ACh na presença do PVAT (**Figura 10C e 10D**). Estes dados nos sugerem que, fisiologicamente, o receptor TLR4 no PVAT pode ter papel mais importante no controle do tônus vascular do que propriamente na célula endotelial. Uma vez que um dos principais papéis fisiológicos do PVAT é o seu efeito anticontrátil, optamos por investigar, deste ponto em diante, o papel do TLR4 expresso no PVAT sobre a modulação da resposta contrátil vascular.

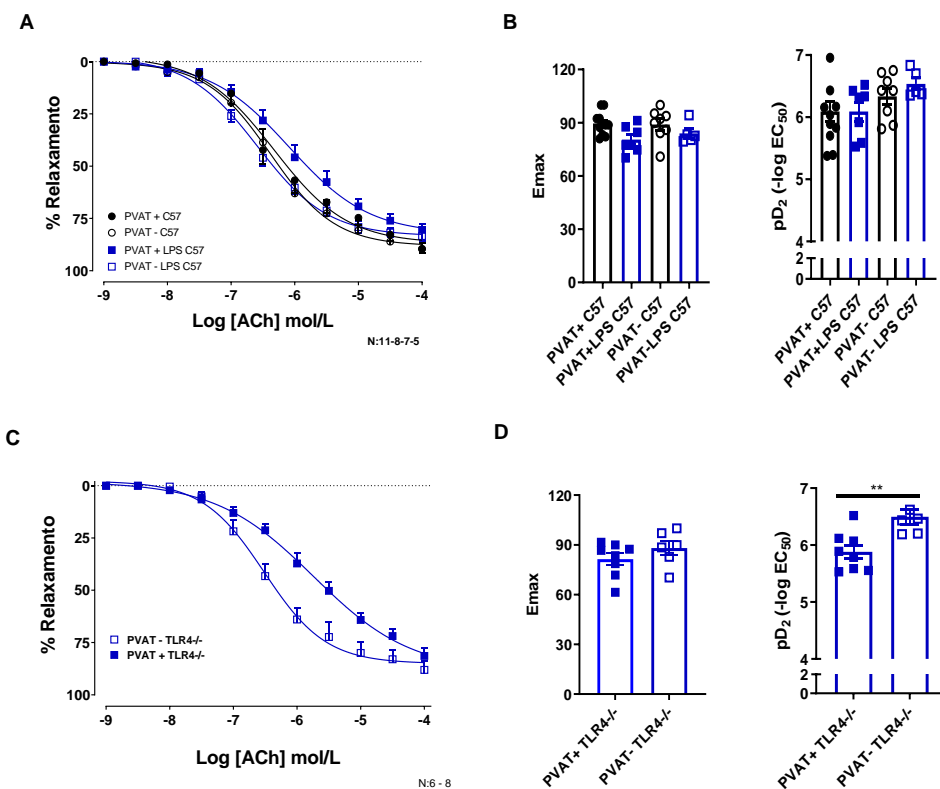


Figura 10. Relaxamento vascular induzido pela acetilcolina em camundongos C57BL/6J e camundongos nocaute para TLR4 (TLR4^{-/-}) e efeito do estímulo com LPS no relaxamento dos camundongos C57. A. Curvas de resposta vasodilatadora a ACh (10^{-9} - 10^{-4} mol / L) em anéis de aorta

de camundongos C57BL/6J com e sem PVAT (PVAT+/-), incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min. **B e D.** As barras representam média ± erro padrão; dos valores de Emax e pD2 do relaxamento induzido pela Ach obtidas em preparações independentes. **C.** Curvas de resposta vasodilatadora a Ach (10⁻⁹-10⁻⁴mol / L) em anéis de aorta de camundongos TLR4^{-/-} com e sem PVAT (PVAT+/-). Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=6-10). As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA a um fator). * Representa diferença significativa quando comparados (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05).

Ao avaliarmos o papel do endotélio sobre o efeito anticontrátil do PVAT, observamos que o efeito do PVAT é independente de endotélio (**Figura 11A e 11B**). A remoção do endotélio não modificou o efeito anticontrátil do PVAT em animais C57 (**Figura 11A e 11B**). Ao promover a ativação do TLR4 com LPS, pudemos observar que o LPS abole o efeito anticontrátil do PVAT (**Figura 11C e 11D**). Ao utilizarmos os animais TLR4^{-/-}, observamos que a ausência do receptor, por si só, reduz o perfil contrátil vascular (**Figura 11E e 11F**), de maneira igual na presença ou ausência de PVAT, similar ao perfil dos animais C57 PVAT⁺. A incubação com LPS não alterou o perfil de contração nos animais TLR4^{-/-}, independentemente da presença do PVAT (**Figura 11G e 11H**).

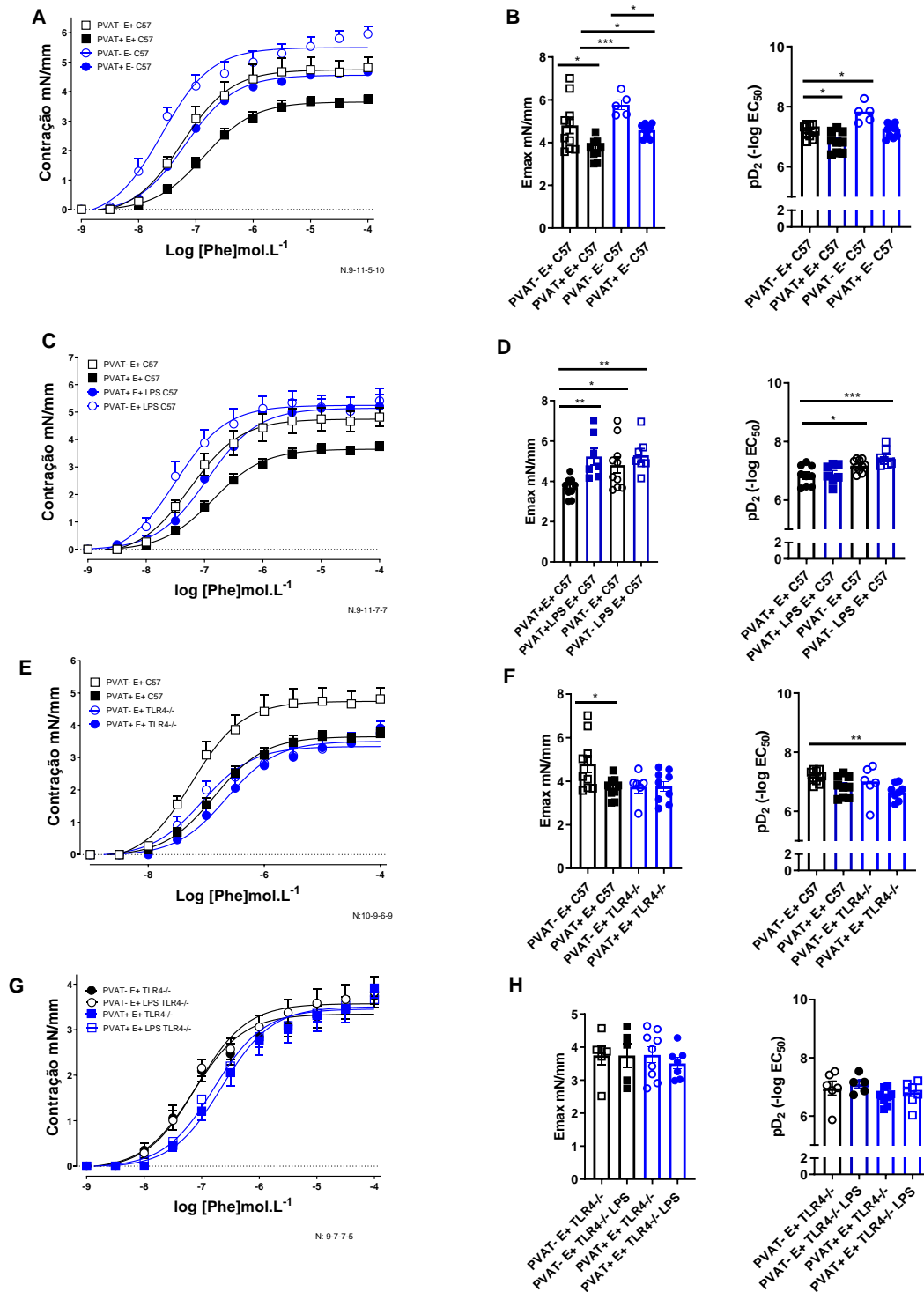


Figura 11. Contratilidade vascular em vasos de camundongos C57BL/6J com e sem endotélio, e camundongos nocaute para TLR4 na presença e ausência do PVAT e efeito do estímulo com LPS. **A.** Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J com PVAT ou sem PVAT (PVAT^{+/-}) e com ou sem endotélio (E^{+/-}). **C.** Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J com e sem PVAT (PVAT^{+/-}) incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min. **E.** Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos TLR4^{-/-} e C57BL/6J com e sem PVAT (PVAT^{+/-}). **G.** Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos TLR4^{-/-} com e sem PVAT (PVAT^{+/-}) incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min. **B-D-F-H.** As barras

representam média \pm erro padrão; dos valores de Emax e pD2 da contratilidade induzida pela Fen obtidas em preparações independentes. Os valores representam a média \pm EPM obtida em diferentes preparações (n=6-11). As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA a um fator). * Representa diferença significativa quando comparados (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05).

CONCLUSÃO PARCIAL 2

O PVAT não altera o relaxamento dependente de endotélio.

A ativação dos receptores TLR4 com LPS não altera o relaxamento dependente de endotélio.

Confirmamos o efeito anticontrátil do PVAT.

A ativação dos receptores TLR4 com LPS abole o efeito anticontrátil do PVAT.

Na ausência do PVAT, o estímulo com LPS não altera a resposta contrátil na presença do endotélio funcional.

A deleção do TLR4 por si só reduz o perfil contrátil a níveis semelhantes ao animal C57 na presença do PVAT. O PVAT não apresenta adicional efeito anticontrátil nos animais TLR4^{-/-}.

Neste ponto, temos fortes indícios de que a ativação do receptor TLR4 expresso no PVAT leva a perda do seu efeito anticontrátil. Esta ideia é suportada pela perda do efeito do LPS nos animais TLR4^{-/-}.

Como vários trabalhos sugerem que o NO talvez seja o mais importante responsável pelo efeito anticontrátil do PVAT, decidimos investigar a via do NO na perda do efeito anticontrátil do PVAT induzida pelo LPS. A inibição não seletiva das NOS com o L-NAME, como esperado, aumentou a resposta contrátil a Fen, em presença do PVAT (**Figura 12A**). Na presença do LPS, o L-NAME também aumenta o perfil contrátil (**Figura 12A**). Contudo, o aumento da contração nos vasos tratados com L-NAME+LPS foi proporcionalmente menor do que na ausência do LPS, visto que o LPS já induz aumento no perfil contrátil (**Figura 12A e 12B**). Tal resultado pode ser melhor evidenciado pelo delta da AUC dos vasos tratados ou não com L-NAME (**Figura 12C**). Este resultado sugere uma menor biodisponibilidade de NO na presença do LPS.

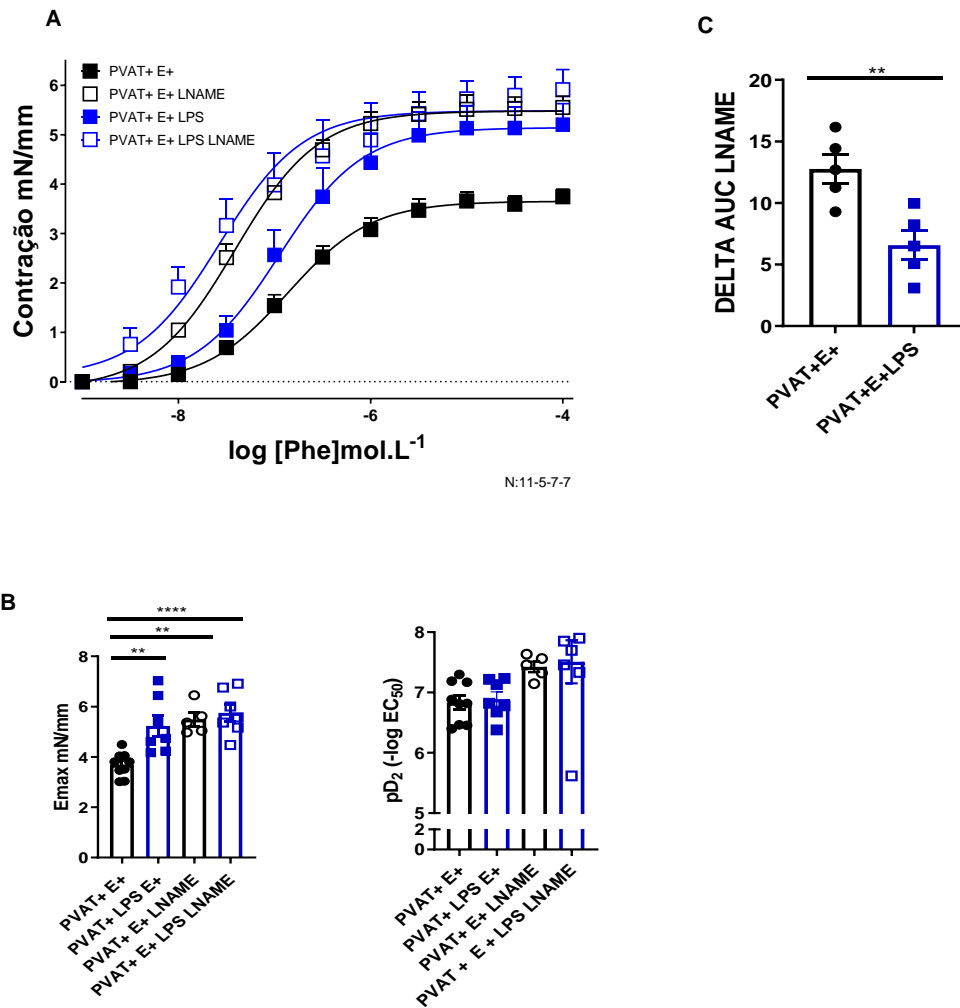


Figura 12. Efeito do bloqueio da síntese do óxido nítrico com o inibidor não seletivo L-NAME sobre a contratilidade em anéis de aorta torácica com PVAT de camundongos C57BL/6J, estimulados ou não com LPS. (A) Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta com PVAT (PVAT+) incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min, L-NAME ou LPS e L-NAME. (B) Valores de Emax e pD₂ dos experimentos de contração vascular. (C) Delta da área abaixo da curva de concentração-resposta à fenilefrina (AUC) com L-NAME. Os resultados são expressos como média ± erro padrão. Para reatividade vascular, Emax e pD₂ as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA a um fator). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01). Para Delta AUC L-NAME Teste t de Student (*p<0,05).

Estes dados corroboram com os nossos dados anteriores que sugerem uma perda na biodisponibilidade de NO após o tratamento com LPS, sobretudo, no PVAT. Como descartamos inicialmente a participação da iNOS no nosso modelo celular, investigamos o estado de ativação da eNOS após o tratamento com LPS. A literatura descreve que uma importante via de fosforilação do sítio de inativação da eNOS (eNOS^{thr495}) é a via das MAPK, especialmente a ERK1/2. Para testar se a ativação do TLR4 pelo LPS levaria a ativação da ERK e conseqüente aumento de fosforilação da eNOS^{thr495}, reduzindo os níveis de NO, utilizamos o

inibidor farmacológico das ERK, o PD98059. O tratamento com o PD98059 não alterou os níveis de contração nas preparações controle, mas restaurou o efeito anticontrátil do PVAT em presença de LPS (**Figura 13**). Para saber se a redução da contração vascular na presença do PD98059 foi devido a uma restauração dos níveis de NO, utilizamos a sonda fluorescente DAF-FM para inferir os níveis de NO tanto na aorta quanto no PVAT de vasos contendo ou não PVAT. A ativação do TLR4 com o LPS não modificou significativamente a produção endotelial de NO nas aortas sem PVAT (**Figura 14 A e B**). Além disso, a incubação com o PD98059 não alterou os níveis de NO endotelial nas aortas sem PVAT tratadas ou não com LPS (**Figura 14**). Contudo, nos vasos contendo PVAT, o tratamento com LPS reduziu significativamente a biodisponibilidade de NO no PVAT (**Figura 15**). A inibição das ERK com o PD98059, isoladamente, não alterou os níveis de NO. No entanto, o tratamento com PD98059 restaurou a produção de NO pelo PVAT estimulado com LPS, alcançando valores semelhantes aos observados no grupo controle. (**Figura 15**).

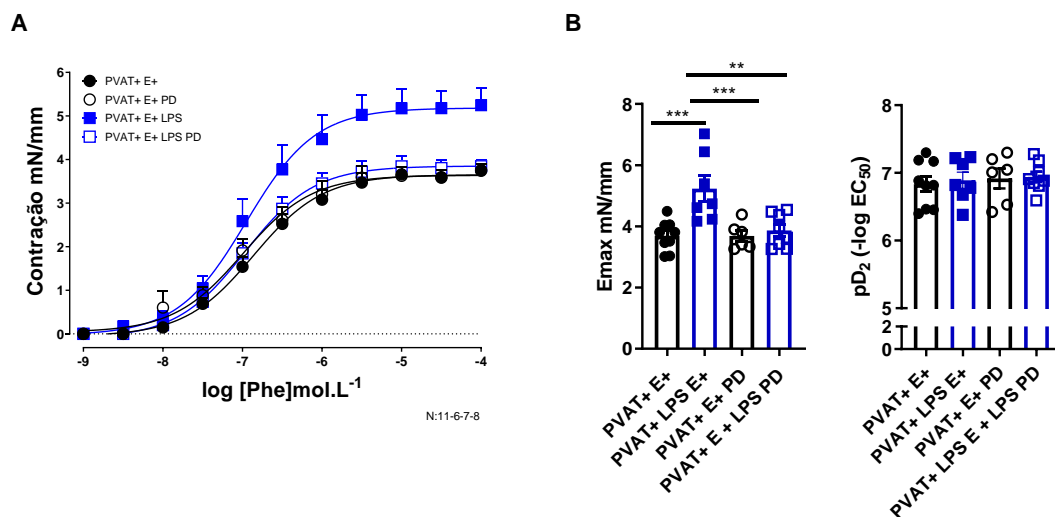


Figura 13. Efeito do bloqueio da ativação de ERK com PD98059 na contratilidade vascular em camundongos C57BL/6J com PVAT, estimulados ou não com LPS. (A) Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J com PVAT(PVAT+) incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059. (B) Valores de Emax e pD₂ dos experimentos de contração vascular. Os resultados são expressos como média ± erro padrão. Para reatividade vascular, Emax e pD₂ as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA a um fator). * Representa uma diferença significativa (**** p < 0,0001, *** p < 0,001, ** p < 0,01).

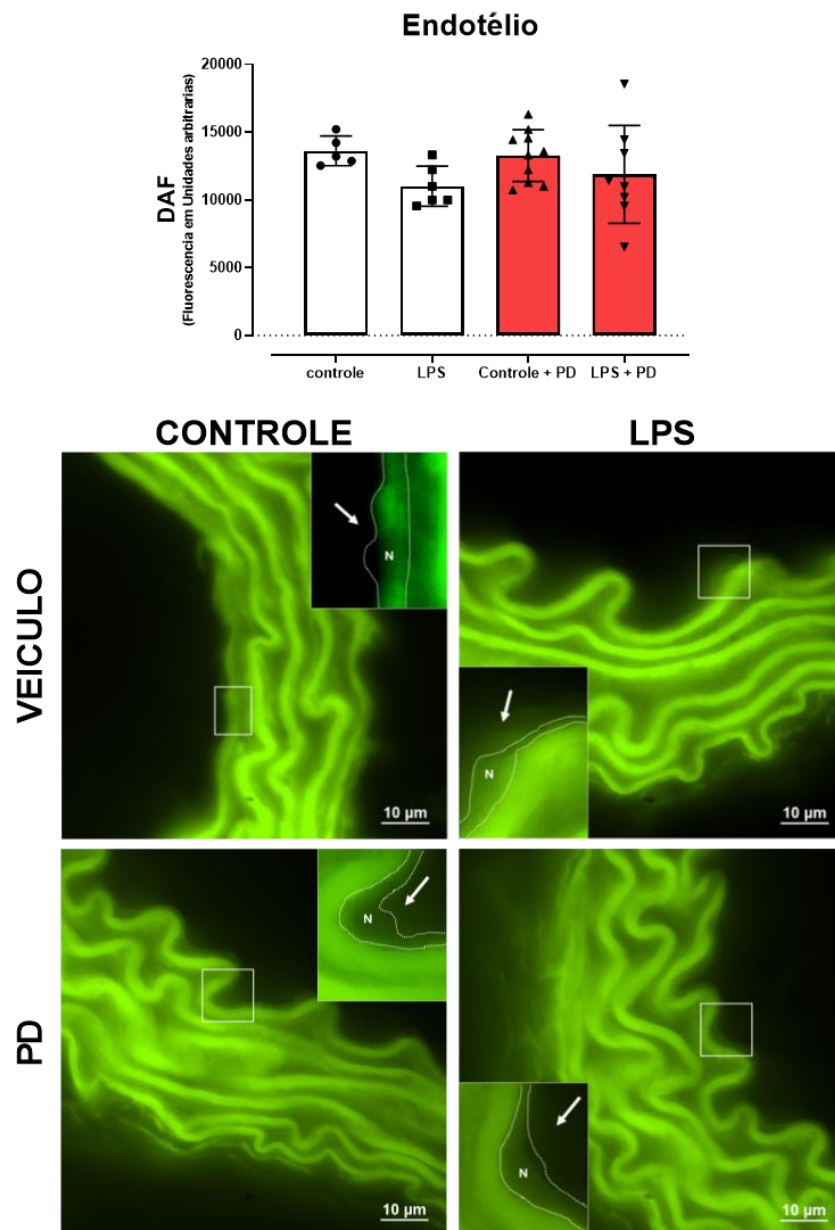


Figura 14. Produção de NO por fluorescência no endotélio em cortes de aorta incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min com e sem PD98059. A. Intensidade de fluorescência emitida pela sonda seletiva de NO (DAF-FM DA) mostrando a localização de NO no endotélio em cortes sem PVAT de camundongos C57. **B.** Imagens representativas de anéis aórticos sem PVAT. N:núcleo. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e as barras representam média ± erro padrão; n=6 por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05 quando comparados).

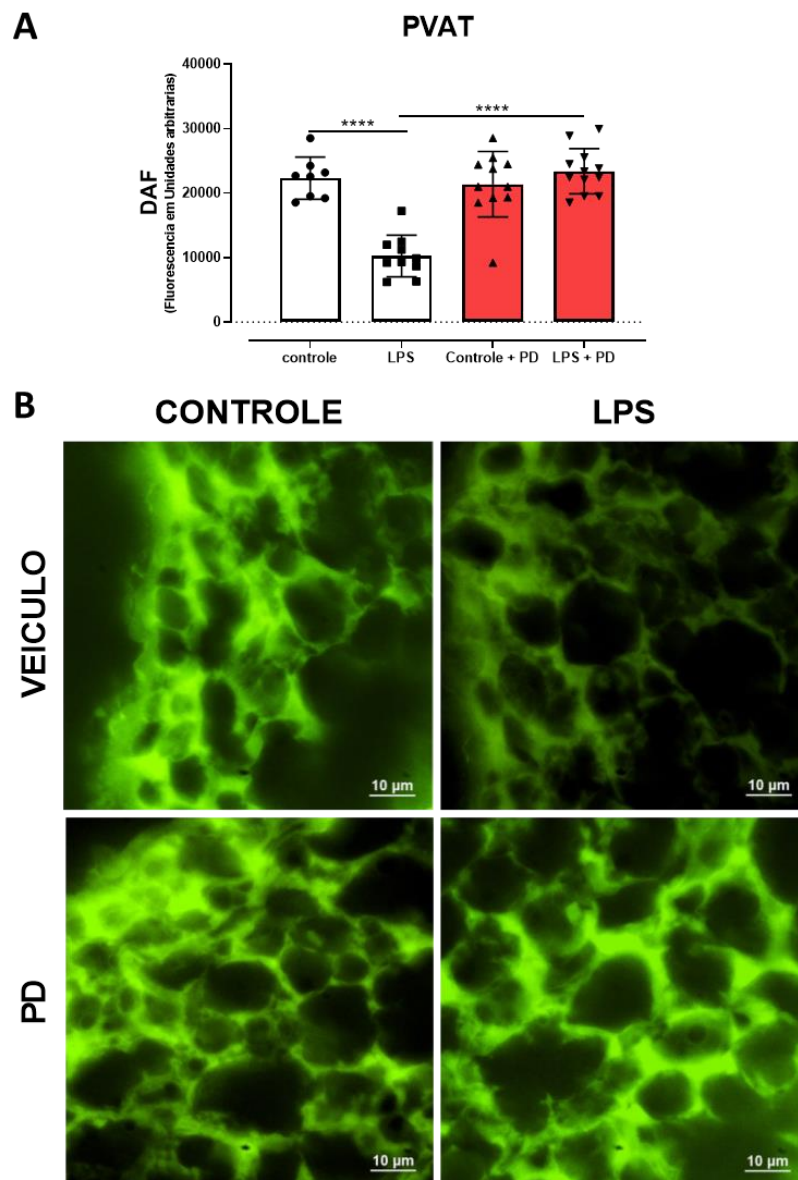


Figura 15. Produção de NO por fluorescência no PVAT em cortes de aorta incubados ou não com LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ por 30 min com ou sem PD98059. A. Intensidade de fluorescência emitida pela sonda seletiva de NO (DAF-FM DA) mostrando a presença de NO no PVAT em cortes de aorta de camundongos C57. **B.** Imagens representativas do PVAT. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e as barras representam média \pm erro padrão; $n=6$ por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, quando comparados).

O estado de ativação da eNOS pode ser inferido pelos níveis de fosforilação de seus sítios de ativação (eNOS^{ser1177}) ou inativação (eNOS^{thr495}). Para se avaliar o papel da ERK1/2 sobre a atividade da eNOS, após o tratamento com LPS, avaliamos os níveis de expressão e de fosforilação da eNOS na presença de PD98059. Confirmamos que o estímulo agudo com LPS não modificou a expressão total de eNOS tanto no endotélio (**Figura 16**) quanto no PVAT (**Figura 17**). Ao avaliarmos o estado de fosforilação da eNOS, observamos que o LPS reduziu

de maneira discreta a fosforilação da eNOS^{ser1177} tanto nas células endoteliais (**Figura 18**) quanto no PVAT (**Figura 19**). Por outro lado, ao analisarmos o nível de fosforilação em eNOS^{thr495}, principal alvo de fosforilação da ERK1/2, observamos que o LPS aumenta em quase 100% a fosforilação no endotélio (**Figura 20**) e quase 400% no PVAT (**Figura 21**), o que foi completamente revertido pelo tratamento com o PD98059. O tratamento com o PD98059 não alterou a fosforilação no controle, tanto nas células endoteliais (**Figura 20**) quanto no PVAT (**Figura 21**). Em conjunto, estes dados sugerem que, o LPS inibe de maneira muito mais importante a ativação da eNOS pela fosforilação em thr495 e consequente redução na produção de NO no PVAT do que no endotélio.

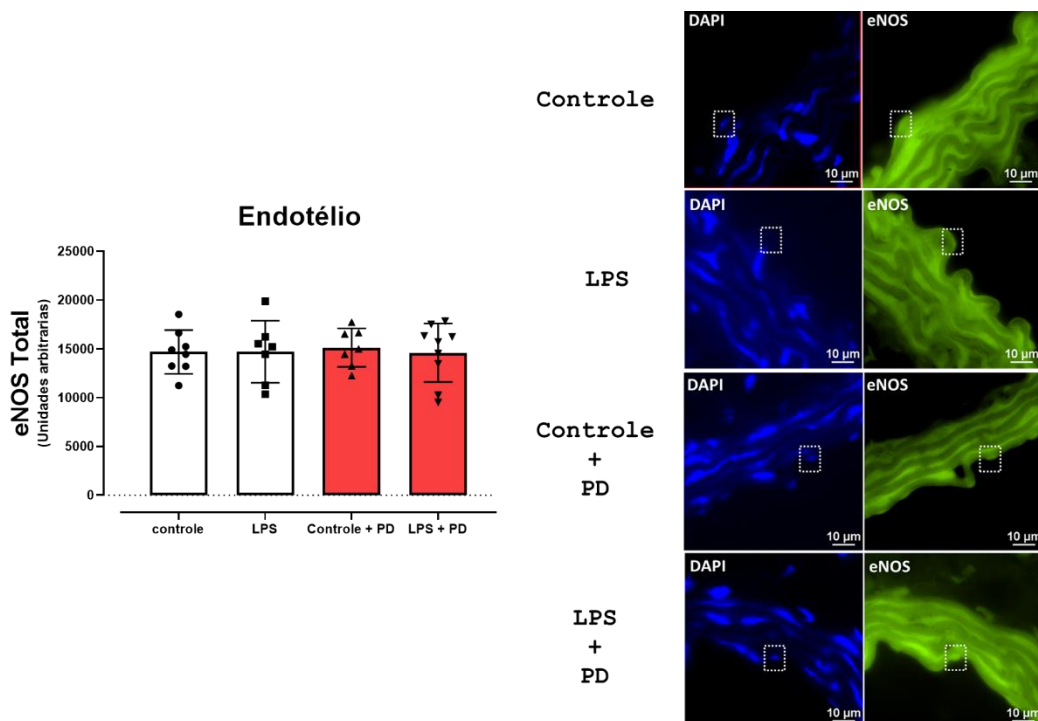


Figura 16. Determinação da expressão de eNOS por imunofluorescência no endotélio em cortes de aorta torácica sem PVAT incubados ou não com LPS 1 μg/ml por 30 min e PD98059. (A) Intensidade de fluorescência de eNOS (B). Imagens representativas. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média ± erro padrão; n=6 por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05, quando comparados).**

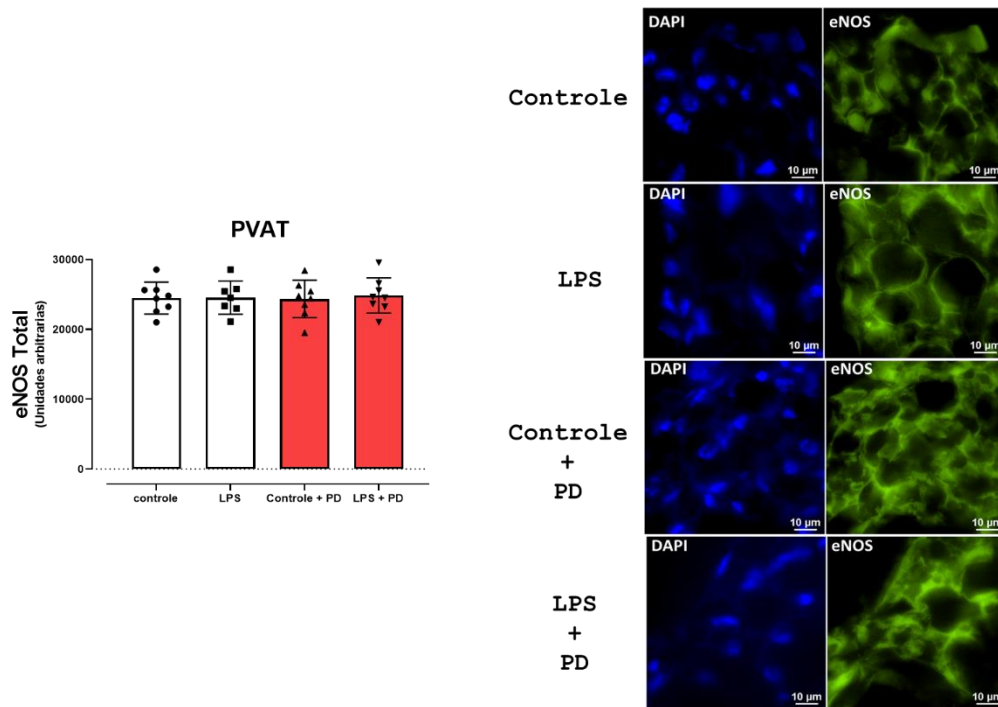


Figura 17. Determinação da expressão de eNOS por imunofluorescência no PVAT em cortes de aorta torácica com PVAT incubados ou não com LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ por 30 min e PD98059. (A) Intensidade de fluorescência de eNOS (B). Imagens representativas. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média \pm erro padrão; $n=6$ por grupo, as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, quando comparados).

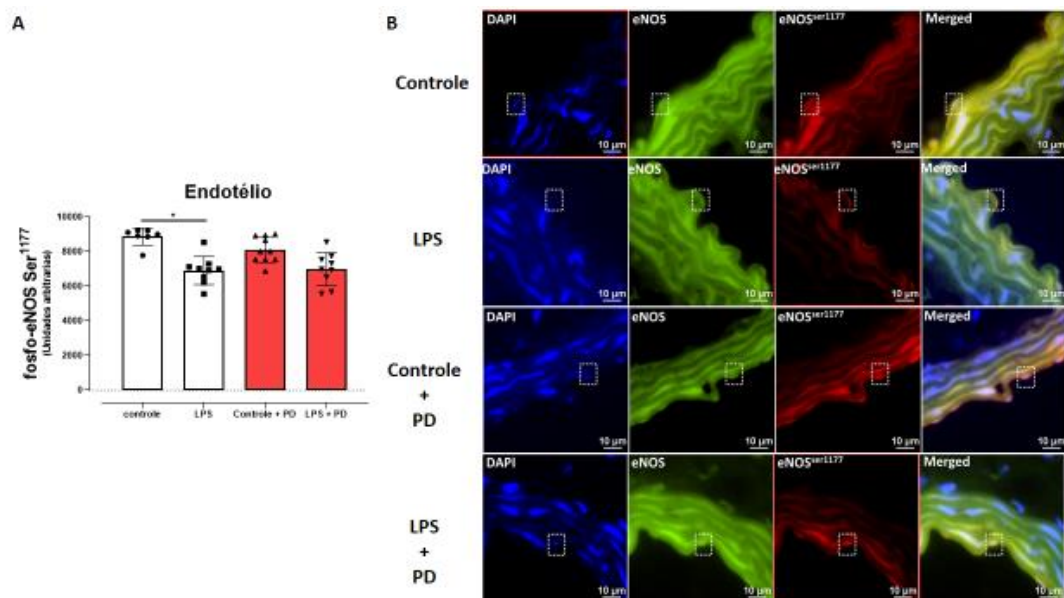


Figura 18. Determinação da expressão de eNOSser1177 por imunofluorescência no endotélio em cortes de aorta torácica sem PVAT incubados ou não com LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ por 30 min e PD98059. (A) Intensidade de fluorescência de eNOSser1177 (B). Imagens representativas. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média \pm erro padrão; $n=6$ por grupo, as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, quando comparados).

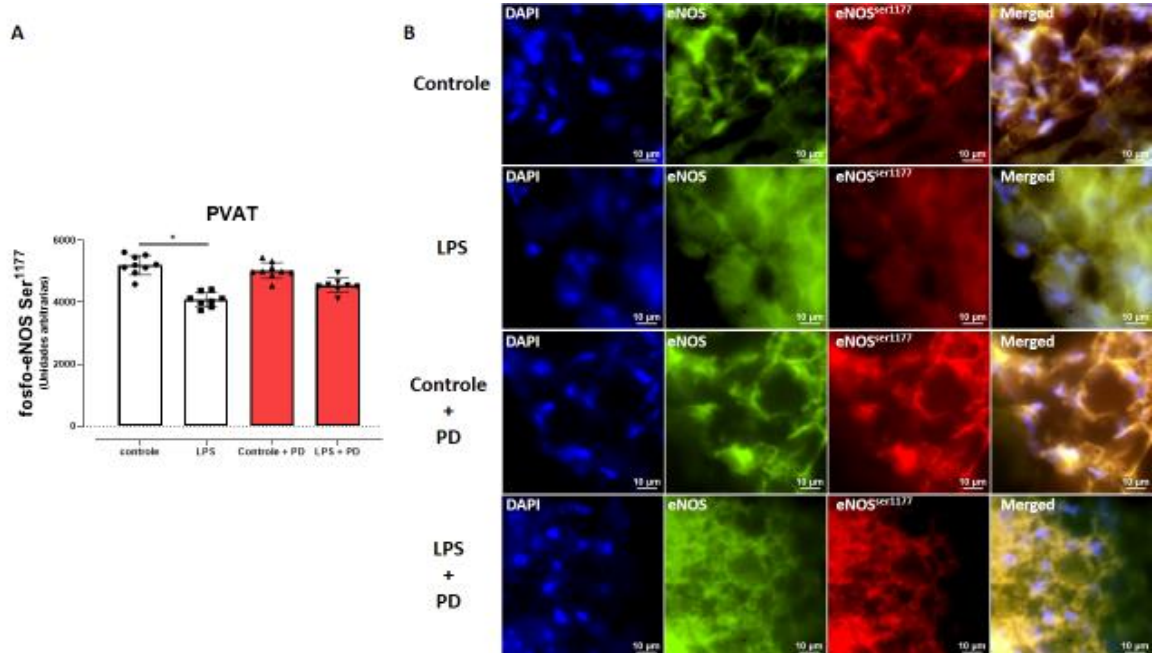


Figura 19. Determinação da expressão de eNOSser1177 por imunofluorescência no PVAT em cortes de aorta torácica com PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059. (A) Intensidade de fluorescência de eNOSser1177 (B). Imagens representativas. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média ± erro padrão; n=6 por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0,05, quando comparados).

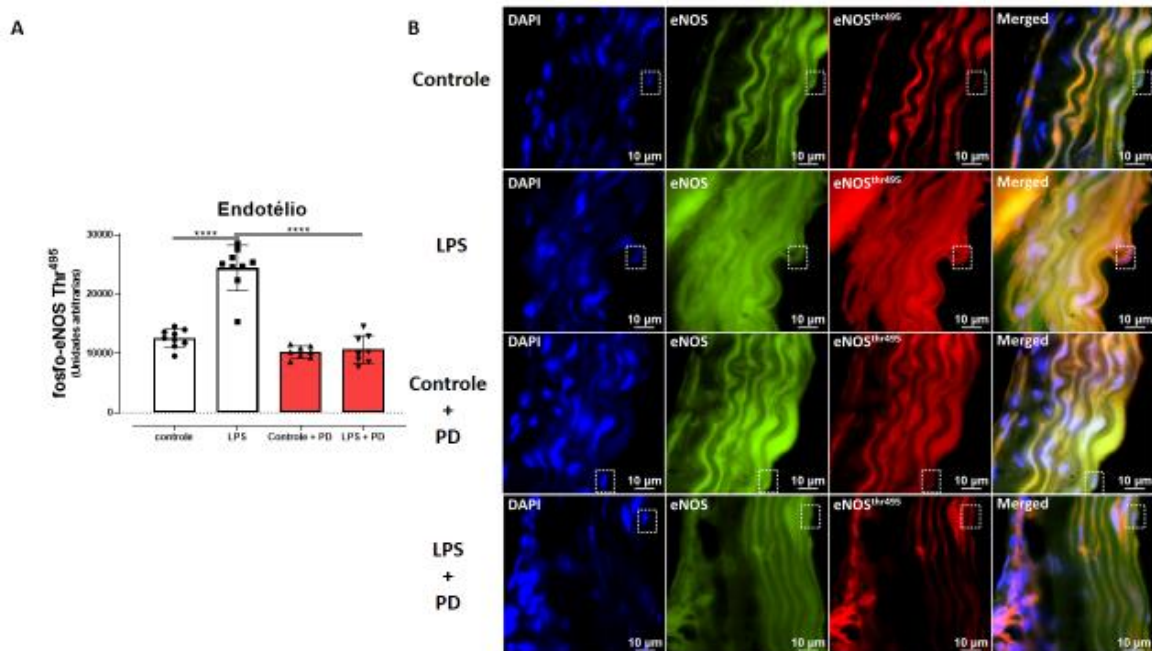


Figura 20. Determinação da expressão de eNOSthr495 por imunofluorescência no endotélio em cortes de aorta torácica sem PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059. (A) Intensidade de fluorescência de eNOSthr495 (B). Imagens representativas. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média ± erro padrão; n=6 por grupo, as

medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05, quando comparados).

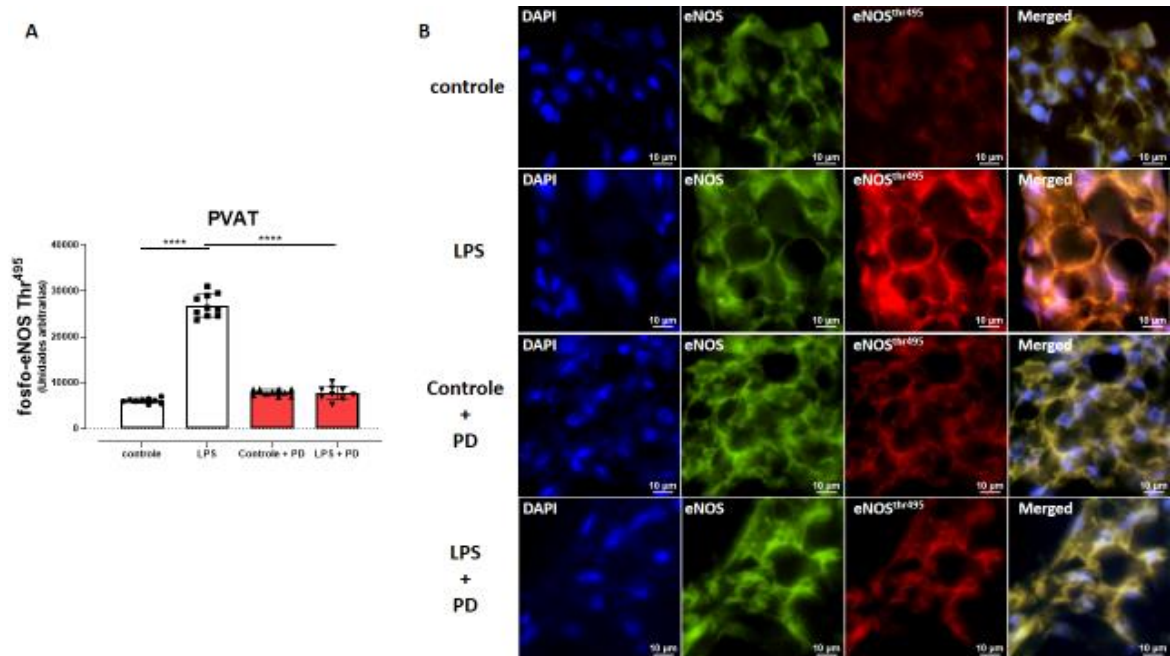


Figura 21. Determinação da expressão de eNOS^{Thr495} por imunofluorescência no PVAT em cortes de aorta torácica com PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059. (A) Intensidade de fluorescência de eNOS^{Thr495} (B). Imagens representativas. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média ± erro padrão; n=6 por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, *p<0.05, quando comparados).**

Como relatado anteriormente, o LPS conhecidamente ativa a via de sinalização das MAPKs, promovendo a fosforilação da ERK1/2 (p-ERK^{Thr177}), ativando-a. A ativação dessa quinase foi avaliada por meio da detecção de sua forma fosforilada em Thr177 por Western blot, após o tratamento com LPS, na ausência ou presença do inibidor seletivo da ERK, PD98059. O tratamento com LPS aumentou a fosforilação da ERK1/2^{Thr177}, efeito prevenido pelo inibidor de ERK PD98059 nas aortas (células endoteliais e músculo liso) e no PVAT (Figura 22).

CONCLUSÃO PARCIAL 3

A inibição das NOS com o L-NAME abole o efeito anticontrátil do PVAT.

O L-NAME não apresenta efeito adicional sobre a contração em preparações contendo PVAT e estimuladas com LPS.

A inibição da ERK1/2 com o PD98059 restaura o efeito anticontrátil do PVAT após estímulo dos receptores TLR4 com LPS.

O estímulo com LPS não modifica a biodisponibilidade de NO endotelial. O PD98059 também não modifica a detecção de NO endotelial na presença ou ausência de LPS.

O estímulo com LPS reduz a biodisponibilidade de NO no PVAT, a qual é restabelecida pela inibição da ERK1/2 com o PD98059.

No endotélio, o estímulo com LPS reduz discretamente a fosforilação da eNOSser1177 mas aumenta consideravelmente a fosforilação em eNOSthr495. O tratamento com o PD98059 inibe o efeito do LPS.

No PVAT, o estímulo com LPS também reduz de forma discreta a fosforilação da eNOSser1177 mas aumenta em aproximadamente 3 vezes a fosforilação em eNOSthr495. O tratamento com o PD98059 também abole o efeito do LPS.

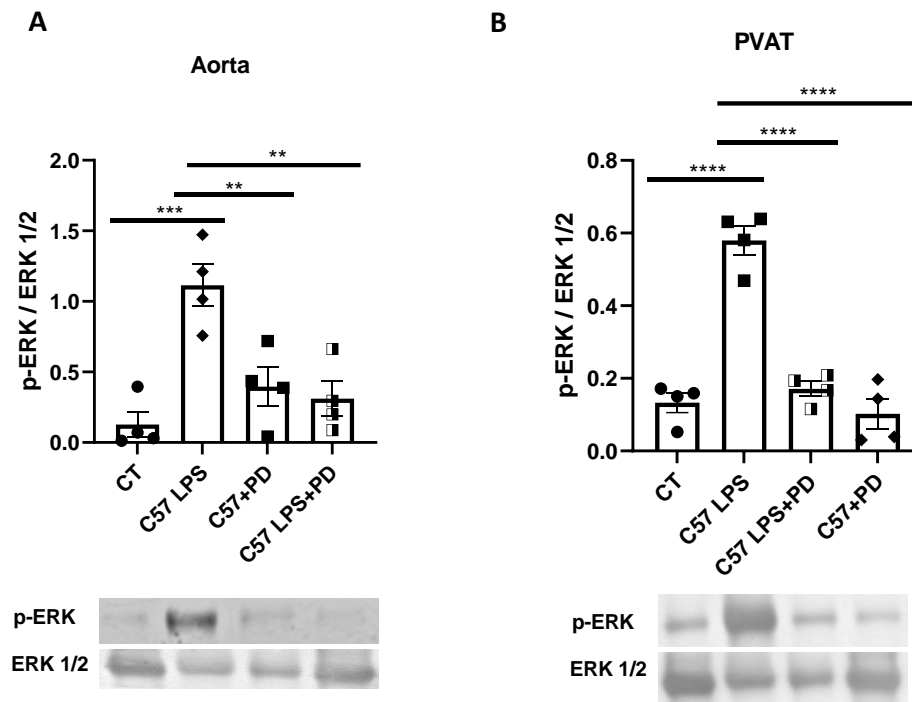


Figura 22. Ativação da ERK1/2 na aorta (A) e no PVAT (B) Expressão da ERK1/2 fosforilada no sítio de ativação Thr177 ($p\text{-ERK1/2}^{\text{Thr177}}$) corrigido pela ERK1/2 total, por Western blot. As imagens são representativas de 4 experimentos usando anticorpo anti $p\text{-ERK1/2}^{\text{Thr177}}$ e anti ERK1/2. Foram utilizados extratos proteicos de aorta torácica (células endoteliais e músculo liso) e do PVAT. As barras representam média \pm erro padrão; $n=4$ por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, quando comparados).

A literatura é bastante consistente no que diz respeito a produção de espécies reativas de oxigênio após ativação da ERK1/2 em tecido vascular. Como observamos no nosso modelo que a ativação do TLR4 pelo LPS no PVAT leva a ativação da ERK1/2 e consequente comprometimento da função vascular, decidimos avaliar o impacto do tratamento com LPS sobre a produção de ROS no PVAT. O tratamento dos anéis de aorta com o Tiron, sequestrador de ROS, aumentou a contratilidade vascular nos vasos contendo PVAT e não atenuou a resposta contrátil nos vasos tratados com LPS (**Figura 23**). Para se confirmar que a estimulação com LPS aumentava de fato a produção de ROS no tecido vascular, utilizamos a sonda fluorescente DHE. O tratamento com LPS aumentou a produção de ROS nas células endoteliais (**Figura 24**). Além disso, o tratamento com PD98059 inibiu o aumento da fluorescência, indicando que a ERK contribui para o aumento de ROS induzido pelo LPS nas células endoteliais (**Figura 24**). Por outro lado, ao avaliarmos o PVAT, pudemos observar que o LPS aumenta significativamente a produção de ROS (**Figura 25**), a qual é inibida completamente pela inibição da ERK com o PD98059 (**Figura 25**).

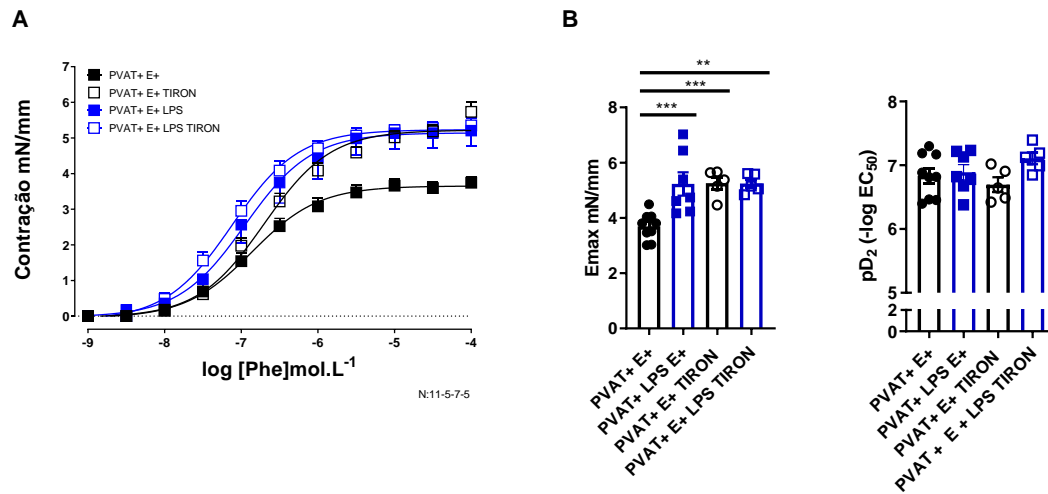


Figura 23. Efeito do Tiron, sequestrador de ROS, na contratilidade vascular em camundongos C57BL/6J com PVAT, estimulados ou não com LPS. (A) Curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J com PVAT (PVAT+) incubados ou não com LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ por 30 min e Tiron. (B) Valores de Emax e pD₂ dos experimentos de contração vascular. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para reatividade vascular, Emax e pD₂ as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA a um fator). * Representa uma diferença significativa (**** p < 0,0001, *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05).

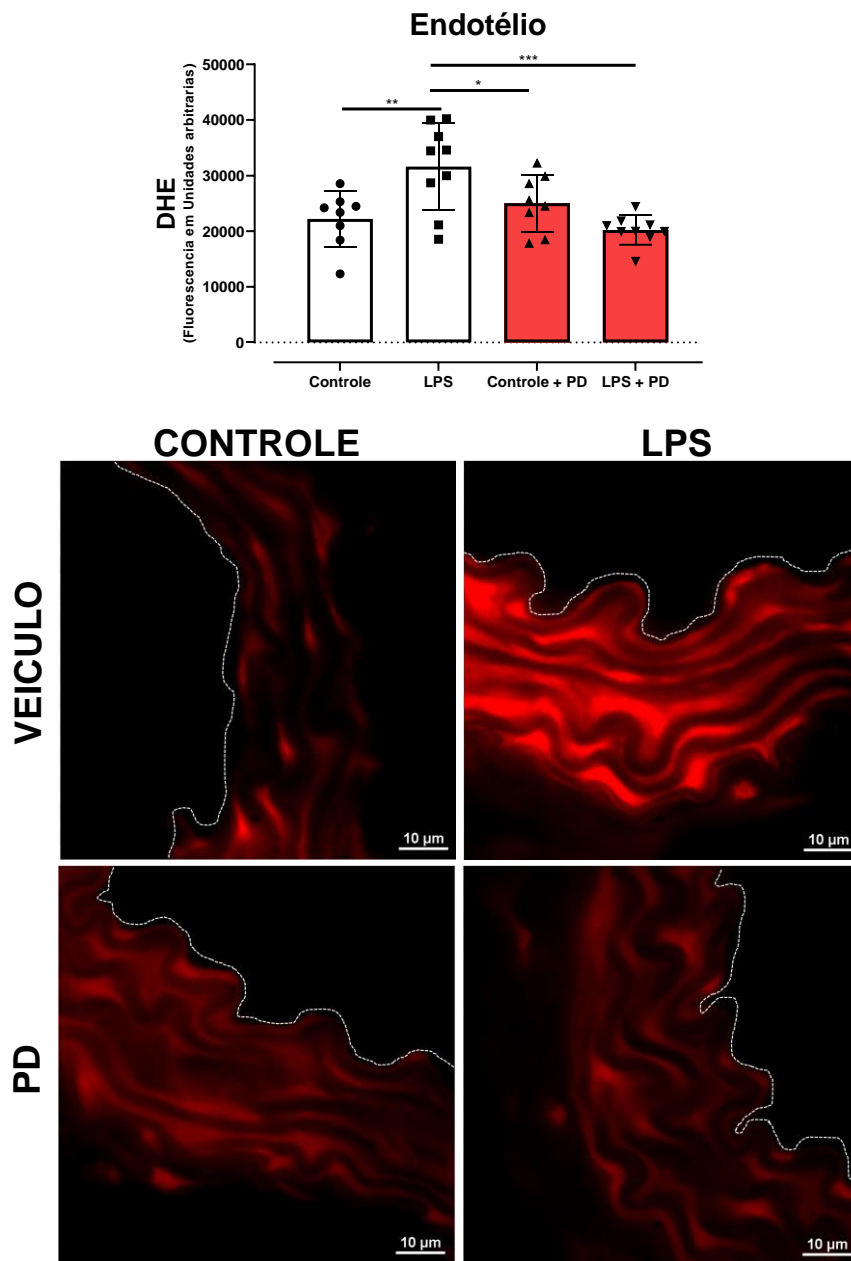


Figura 24. Produção de ROS (DHE) por fluorescência em cortes de aorta sem PVAT incubados ou não com LPS 1 µg/ml por 30 min e PD98059. A. Intensidade de fluorescência emitida pela sonda seletiva de DHE mostrando a localização de ROS em cortes de aorta de camundongos C57. **B.** Imagens representativas. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média \pm erro padrão; n=6 por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, p<0.05), quando comparados.

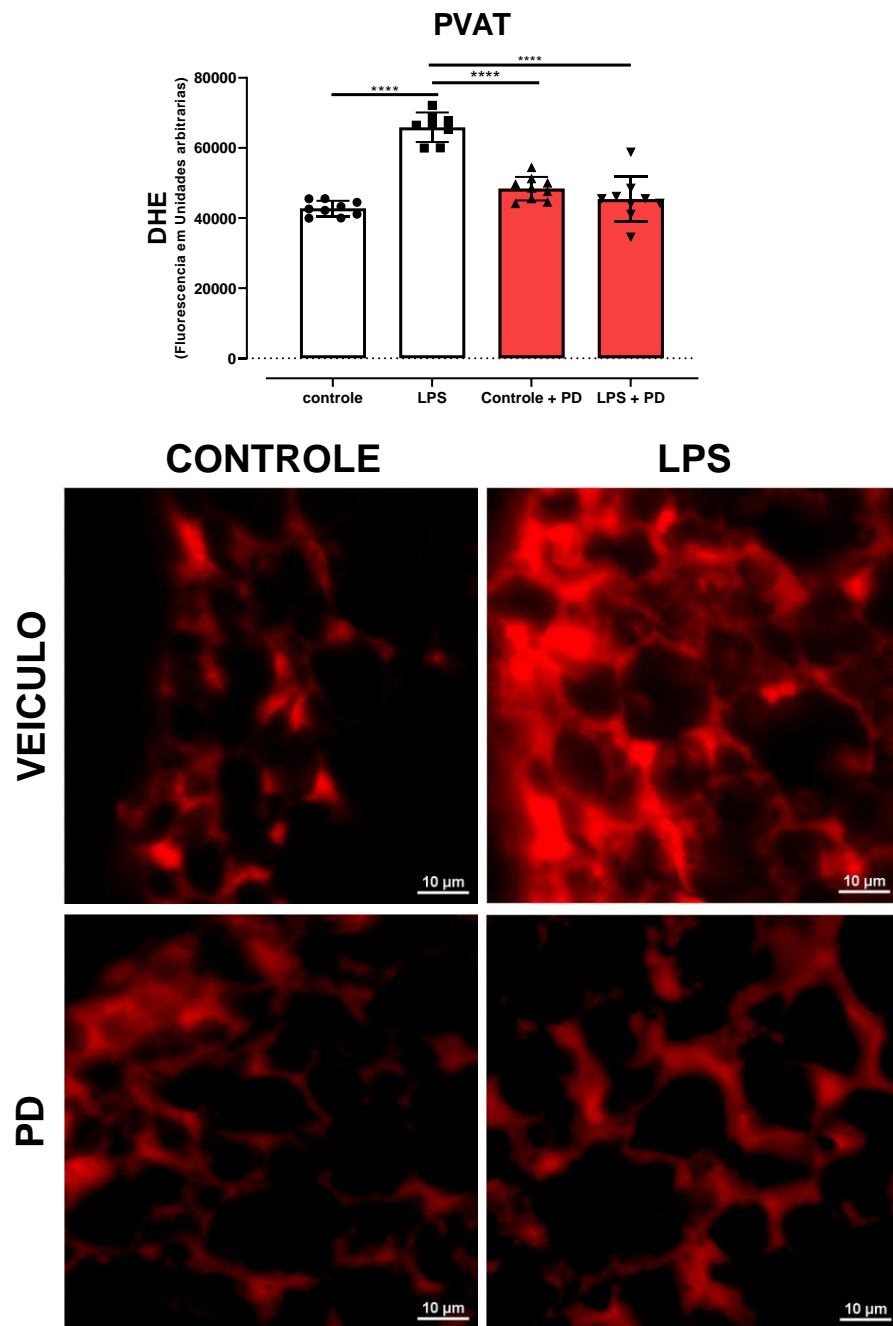


Figura 25. Produção de ROS (DHE) por fluorescência no PVAT em cortes de aorta com PVAT incubados ou não com LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ por 30 min e PD98059. A. Intensidade de fluorescência emitida pela sonda seletiva de DHE mostrando a localização de ROS no PVAT de camundongos C57. **B.** Imagens representativas do PVAT. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. As barras representam média \pm erro padrão; n=6 por grupo, as medias foram comparadas por análise de variância (ANOVA de uma via com teste post-hoc de Tukey). * Representa uma diferença significativa (**** p < 0,0001, *** p < 0,001, ** p < 0,01, p < 0,05), quando comparados.

CONCLUSÃO PARCIAL 4

O estímulo do TLR4 com LPS aumenta a fosforilação no sítio de ativação da ERK1/2 (ERK1/2^{thr177}) no endotélio e no PVAT.

O tratamento com o antioxidante Tiron não restaura o efeito anticontrátil do PVAT na presença de LPS.

O estímulo do TLR4 com LPS aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio no endotélio e no PVAT, a qual é abolida pelo tratamento com o inibidor da ERK1/2, PD98059.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo aponta, de maneira inédita, que os receptores TLR4 são essenciais fisiologicamente para manutenção do efeito anticontrátil do PVAT. Especificamente, sugerimos aqui que a ativação aguda do receptor no PVAT, em estágios que antecedem os eventos transcrpcionais da via do TLR4, leva a ativação da ERK1/2 com consequente fosforilação da eNOS^{thr495}, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e redução da biodisponibilidade de NO, com perda do efeito anticontrátil.

Diversas evidências indicam uma estreita interação entre a via de sinalização do receptor Toll-like 4 (TLR4) e a regulação das isoformas da óxido nítrico sintase — tanto a forma constitutiva endotelial (eNOS) quanto à forma induzível (iNOS) — em diferentes condições inflamatórias agudas e crônicas, incluindo sepse, aterosclerose, obesidade, diabetes mellitus e doenças reumáticas inflamatórias, como a artrite reumatoide (HUANG; CHEN; YANG; HONG, 2023; KIM; PHAM; LUTTRELL; BANNERMAN *et al.*, 2007; LIANG; LIU; WANG; XU *et al.*, 2013; LUO; LUO; CHENG; YANG *et al.*, 2020; STARK; KOCH; CHOI; MACE *et al.*, 2017; ZHU; PENG; LI; TU *et al.*, 2020).

Na sepse, a produção excessiva de NO representa um dos principais determinantes da disfunção cardiovascular associada ao choque séptico, promovendo vasodilatação exacerbada e hipotensão mediadas pela iNOS (CINELLI; DO; MILEY; SILVERMAN, 2020). Além disso, há evidências de que, na fase inicial da sepse, ocorre uma disfunção endotelial caracterizada pelo desacoplamento ou aumento da fosforilação da eNOS^{thr495}, contribuindo para redução na biodisponibilidade de NO e do tônus vascular. Em estágios mais avançados, observa-se redução da expressão da eNOS com perda progressiva da capacidade vasodilatadora endotelial, agravando o comprometimento hemodinâmico (HU; PI; XU; YAN *et al.*, 2021).

Entretanto, a maioria dos estudos concentra-se nos mecanismos relacionados à resposta vasodilatadora mediada pelo endotélio, havendo ainda escassez de investigações sobre os mecanismos pelos quais a ativação do TLR4 poderia modular o tônus vascular basal, ou seja, o estado contrátil vascular. Da mesma forma, permanecem pouco exploradas as possíveis contribuições do TLR4 no tecido adiposo perivascular (PVAT), cuja modulação exerce papel relevante na regulação do tônus vascular. Neste estudo avaliamos o papel modulatório dos

receptores TLR4 sobre o efeito anticontrátil do PVAT e sua relação com as células endoteliais em condições fisiológicas.

O nosso objetivo foi avaliar especificamente os efeitos da ativação aguda do TLR4 – os quais antecedem a transcrição de genes inflamatórios -, sobre a função vascular. Utilizamos, para tal, o LPS como agonista clássico do receptor TLR4 por um curto intervalo de tempo. Contudo, foi necessário, inicialmente, determinar o tempo no qual o estímulo com LPS (1µg/mL) modularia a função da eNOS ou aumentaria a expressão proteica da iNOS e, consequentemente, mudaria a produção estimulada ou basal de NO, respectivamente.

A investigação inicial dos efeitos da ativação aguda dos receptores TLR4 em culturas de células endoteliais nos revelou uma resposta dinâmica e tempo-dependente na produção de óxido nítrico (NO). Nesse contexto, nossos dados demonstram que o estímulo com LPS, induz uma redução significativa na produção basal de NO nos primeiros 30 minutos. Contudo, esse perfil é subsequentemente revertido, com aumento dos níveis de NO após 1 hora de tratamento (**Figura 6A**).

Para avaliar a integridade funcional da via de sinalização da eNOS, as células foram estimuladas com acetilcolina (ACh). No endotélio vascular, a acetilcolina (ACh), ao se ligar ao receptor muscarínico M3, desencadeia um aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} que, por sua vez, ativa a eNOS e a subsequente produção de óxido nítrico, resultando em vasodilatação (SONOBE; KAKINUMA, 2024). Como esperado, em células controle, a ACh promoveu um aumento na produção de NO. Em nítido contraste, nas células pré-tratadas com LPS, a produção de NO em resposta à ACh foi significativamente atenuada, indicando um comprometimento na capacidade de ativação aguda da NOS constitutiva (**Figura 6B**).

Este padrão temporal sugere fortemente a existência de dois fenômenos distintos e sequenciais: uma inibição transitória da atividade das NOS constitutivas na fase inicial (até 30 minutos), seguida pela indução progressiva da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em uma fase posterior (a partir de 1 hora). Para validar esta hipótese, a expressão proteica da iNOS foi quantificada por citometria de fluxo. Os resultados confirmaram que a expressão da iNOS foi significativamente aumentada apenas após 1 hora de estímulo com LPS (**Figura 7**), gerando assim o restabelecimento e potencial aumento dos níveis de NO observado na fase tardia.

Em condições fisiológicas, a produção basal de óxido nítrico (NO) é mantida predominantemente pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), enquanto a expressão da isoforma induzível (iNOS) é mínima e não participa ativamente da homeostase vascular. Com tudo, em contextos patológicos como sepse e aterosclerose, a iNOS emerge como um mediador central da resposta inflamatória. Sua indução resulta na produção exacerbada de NO – podendo alcançar níveis até 1000 vezes superiores aos basais – que, na ausência de quantidades adequadas do cofator BH₄, desvia a síntese para a geração de espécies reativas de oxigênio. Esse desbalanço redox promove a formação de peroxinitrito, um agente nitrosativo que amplifica o dano tecidual, associando-se, assim, à progressão de processos inflamatórios, ateroscleróticos e doenças crônicas (BATTY; BENNETT; YU, 2022; FERDINANDY; SCHULZ, 2003).

Diante desse contexto, optou-se por empregar um estímulo de 30 minutos para avaliar os efeitos imediatos da ativação do TLR4, os quais independem de mecanismos transcricionais e da expressão de genes inflamatórios, como o da iNOS. Com o intuito de confirmar a especificidade da ação do LPS via receptor TLR4, realizou-se seu bloqueio com um anticorpo monoclonal, metodologia consolidada na literatura para este fim (HE; CHEN; WANG; ZOU, 2014; OK; PARK; JANG; BAE *et al.*, 2023; XIAO; ZHAO; XIE; DING *et al.*, 2023). Verificou-se que o estímulo com LPS suprimiu a produção de NO nas células endoteliais EA.hy926. Adicionalmente, observou-se que o bloqueio do TLR4 por si só foi capaz de reduzir a produção basal de NO e, de forma notável, impedir qualquer efeito adicional do LPS. (**Figura 8**). Este resultado demonstra que os efeitos do LPS são mediados exclusivamente pela ativação do TLR4 neste modelo de células endoteliais.

Os dados obtidos em culturas de células endoteliais indicam que a ativação do TLR4 induz disfunção endotelial, caracterizada pela redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) - um mecanismo implicado em diversas condições patológicas, incluindo sepse, hipertensão e aterosclerose (JEON; KIM; KIM, 2017; MAKÓ; CZÚCZ; WEISZHÁR; HERCZENIK *et al.*, 2010; WANG; HE, 2024). No entanto, ao avaliarmos a reatividade vascular em preparações *ex vivo* de órgãos isolados, observamos que o estímulo com LPS não alterou o relaxamento induzido por acetilcolina (**Figura 9A**) nem a contração induzida por fenilefrina (**Figura 9C**) em vasos de animais C57 desprovidos de PVAT. De forma semelhante,

a deleção genética do TLR4 não modificou a resposta vasodilatadora à acetilcolina (**Figura 9E**), mas atenuou a contração induzida por fenilefrina (**Figura 9G**), um achado previamente reportado na literatura (HARRINGTON; LUNDBERG; WAIGHT; ROZARIO *et al.*, 2011; NAVIA-PELAEZ; DIAS; ORELLANO; CAMPOS *et al.*, 2022).

Esses resultados evidenciam uma discrepância entre os efeitos observados em células endoteliais isoladas e as preparações *ex vivo*. Enquanto nas células endoteliais o estímulo com LPS reduz a biodisponibilidade de NO, tal efeito não se traduz diretamente em alterações funcionais nas respostas de relaxamento ou contração em vasos sem PVAT. Vários trabalhos sugerem que diferentes origens ou fontes de células endoteliais podem responder de maneira diferente a diversos agonistas devido a variações nas densidades de receptores de membrana (GERICKE; SNIATECKI; MAYER; GOLOBORODKO *et al.*, 2011; HUANG; CHU; CHEN; JEN, 2000). No nosso estudo, por exemplo, apesar de demonstrarmos em estudos prévios do grupo que as células EA.hy926 respondem a ACh produzindo NO (NAVIA-PELAEZ; CAMPOS; ARAUJO-SOUZA; STERGIOPULOS *et al.*, 2018), um estudo comparativo sobre a quantidade de NO produzido por estas células em comparação a produção de NO em células de camundongo nunca foi realizado. Tais estudos são complexos e pouco precisos tendo em vista a dificuldade técnica da detecção de quantidades precisas de NO devido a sua alta instabilidade e reatividade. Contudo, nossos dados demonstram que, apesar de o LPS reduzir a detecção de NO nas células EA.hy926, não observamos tal redução nas preparações *in situ*. Este fato pode ajudar a explicar por que não observamos redução da resposta vasodilatadora a ACh na presença do LPS.

Considerando que o PVAT exerce papel modulador crítico sobre a função vascular e endotelial, levantamos a hipótese de que a participação do TLR4 nesse tecido possa ser determinante para o fenótipo observado *in vivo*. Sua ausência nos experimentos iniciais pode ter mascarado efeitos que dependem da interação parácrina entre adipócitos perivasculares e endotélio. Por esta razão, investigamos se, além das possíveis diferenças fenotípicas, a interação entre PVAT e endotélio, mediada pelo TLR4, poderia explicar a divergência entre os modelos celulares e as preparações *ex vivo*.

Nossos dados demonstram um papel crucial dos receptores TLR4 na modulação da função vascular mediada pelo tecido adiposo perivascular (PVAT). De forma paradoxal,

observamos que a deleção genica do receptor TLR4 resultou em uma redução da resposta relaxante dependente do endotélio induzida por acetilcolina (ACh) na presença do PVAT (**Figura 10C**). Este achado contrasta marcadamente com os resultados obtidos em animais controles (C57), nos quais a presença do PVAT não alterou significativamente a capacidade de relaxamento vascular (**Figura 10A**). Notavelmente, a ativação aguda do receptor TLR4 com LPS em preparações com PVAT também não promoveu alterações significativas na resposta vasodilatadora. Coletivamente, estes resultados sugerem que a presença dos receptores TLR4 no PVAT é essencial para a manutenção da capacidade vasodilatadora dependente do endotélio. A ausência deste receptor, mais do que sua estimulação aguda, parece comprometer os mecanismos de relaxamento mediados pelo PVAT, indicando que a sinalização constitutiva do TLR4 atua como um modulador chave da comunicação parácrina entre o PVAT e o endotélio vascular. Estes dados são corroborados por dados de Navia-Pelaez et al (2022) que demonstram que tanto o antagonismo quanto a deleção genica do TLR4 reduzem o relaxamento dependente de endotélio como consequência da redução do influxo de cálcio e subsequente redução da atividade da eNOS e da biodisponibilidade de NO. Assim, constitutivamente, o TLR4 parece modular em vários níveis as vias de controle da produção de NO.

Em consonância com a literatura estabelecida, que demonstra um significativo efeito anticontrátil do tecido adiposo perivascular (PVAT) em aorta de camundongos C57 (LÖHN; DUBROVSKA; LAUTERBACH; LUFT *et al.*, 2002; XIA; HORKE; HABERMEIER; CLOSS *et al.*, 2016), os resultados do presente estudo confirmam que o PVAT exerce um pronunciado efeito anticontrátil em preparações de aorta, tanto na presença quanto na ausência de endotélio vascular (**Figura 11**). Este achado corrobora trabalhos anteriores que indicam a capacidade do PVAT em modular a função vascular através de mecanismos independentes do endotélio (GAO; LU; SU; SHARMA *et al.*, 2007; VICTORIO; FONTES; ROSSONI; DAVEL, 2016).

Evidências robustas demonstram que o PVAT preserva sua função anticontrátil diretamente sobre a camada média vascular através de múltiplos mecanismos parácrinos. Dentre estes, destacam-se a liberação de óxido nítrico (NO), a secreção de adipocinas como a adiponectina, a produção de espécies reativas de oxigênio em baixas concentrações (ex.: H₂O₂), além de outros fatores relaxantes derivados do PVAT (LÖHN; DUBROVSKA; LAUTERBACH; LUFT *et al.*, 2002; XIA; HORKE; HABERMEIER; CLOSS *et al.*, 2016). Adicionalmente, vias de sinalização intracelular no próprio PVAT, incluindo a ativação da

AMPK α 1, modulam criticamente essa função anticontrátil (HWEJ; AL-FERJANI; ALSHUWEISHI; NAJI *et al.*, 2024; PAUTZ; LI; KLEINERT, 2021; SAXTON; CLARK; WITHERS; ERINGA *et al.*, 2019).

Para investigar a modulação deste mecanismo pelo receptor TLR4, examinamos o impacto da ativação aguda do receptor nos efeitos anticontráteis do PVAT. Em contraste com o efeito basal, o estímulo agudo com LPS aboliu significativamente o efeito anticontrátil mediado pelo PVAT em aortas com endotélio intacto (**Figura 11C**). Em conjunto, estes resultados corroboram que o TLR4 desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase vascular, atuando provavelmente na regulação de fatores derivados do PVAT que modulam o tônus vascular, principalmente o NO. A demonstração de que o efeito anticontrátil do PVAT persiste na ausência de endotélio, mas é profundamente suprimido pela ativação do TLR4 com LPS, reforça o papel deste tecido como um regulador vascular dinâmico e complexo, com implicações significativas para a compreensão do equilíbrio do tônus vascular em condições fisiológicas e fisiopatológicas.

A análise comparativa entre os modelos experimentais revelou que a deleção do TLR4 reduz significativamente a resposta contrátil vascular, tanto na presença quanto na ausência do PVAT (**Figura 8E**), evidenciando um comprometimento funcional do tecido adiposo perivascular pela ausência deste receptor. Esse achado poderia ser explicado pelo aumento da produção de ROS ou o bloqueio do influxo de cálcio no músculo liso em vasos sem PVAT, descrito por outros autores (HARRINGTON; LUNDBERG; WAIGHT; ROZARIO *et al.*, 2011; NAVIA-PELAEZ; DIAS; ORELLANO; CAMPOS *et al.*, 2022). Adicionalmente, e conforme esperado, em animais TLR4^{-/-} o estímulo com LPS não produziu quaisquer efeitos adicionais na contratilidade vascular (**Figura 8G**), independentemente da presença do PVAT, demonstrando que a integridade do sistema TLR4 é indispensável para a modulação da função vascular pelo PVAT.

Para investigar o envolvimento do óxido nítrico (NO) na modulação dos efeitos induzidos pelo LPS no PVAT, realizamos experimentos empregando o inibidor não-seletivo das óxido nítrico sintases (NOS), L-NAME. A utilização dessa abordagem é amplamente reconhecida na literatura como ferramenta funcional para avaliar a dependência de NO em respostas vasculares (PFEIFFER; LEOPOLD; SCHMIDT; BRUNNER *et al.*, 1996; SANDER;

CHAVOSHAN; VICTOR, 1999). Além disso, sua aplicação possibilita bloquear simultaneamente a produção de NO tanto no endotélio quanto no PVAT. Assim, a comparação das respostas vasculares na presença e ausência de L-NAME permite inferir se os efeitos observados após a ativação do TLR4 dependem de NO ou se refletem mecanismos independentes dessa via.

Em preparações vasculares com PVAT intacto, o bloqueio da síntese de NO pelo L-NAME resultou em um aumento significativo da resposta contrátil (**Figura 12A**), corroborando o papel do NO como um fator relaxante derivado do PVAT. De forma relevante, em anéis pré-tratados com LPS, a administração de L-NAME também promoveu um aumento na contratilidade (**Figura 12A**). No entanto, a magnitude deste efeito foi proporcionalmente menor quando comparada à observada em vasos não expostos ao LPS (**Figura 12B**). Este achado reforça a hipótese de que o tratamento com LPS atenuou a capacidade do PVAT em liberar NO, possivelmente por reduzir sua biodisponibilidade ou comprometer a via de sinalização dependente das NOS.

Para elucidar os mecanismos moleculares responsáveis pela disfunção do PVAT induzida pela ativação aguda do receptor TLR4, investigamos o estado de ativação da eNOS após o estímulo com LPS. A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é uma enzima central na manutenção da homeostase vascular, sendo sua atividade finamente regulada por mecanismos complexos. Além da fosforilação em resíduos específicos, a atividade da eNOS é profundamente influenciada pela sua integridade estrutural como um dímero, pela ligação do complexo Ca^{2+} -calmodulina e pela disponibilidade do cofator tetrahydrobiopterina (BH4) (TRAN; GARCIA; ANIQA; ALI *et al.*, 2022).

A modulação da atividade da eNOS por fosforilação em resíduos específicos constitui um dos principais mecanismos pós-traducionais de controle da produção de NO no endotélio. Estudos fundamentais, como o trabalho de Dimmeler *et al.* (1999), estabeleceram que a fosforilação da Ser1177 por quinases, como a Akt/PKB, é um mecanismo fundamental para a ativação da eNOS e a consequente produção de NO, pois promove o aumento da atividade catalítica da enzima. Esta via de sinalização é desencadeada por estímulos como o shear stress e a VEGF, sendo crucial para a função endotelial (DIMMELER; FLEMING; FISSLTHALER; HERMANN *et al.*, 1999). Outra via de sinalização endotelial importante é a da insulina. Vários

trabalhos sugerem que a insulina induz vasodilatação dependente de endotélio pela ativação da produção de NO via fosforilação da ser1177 (MONTAGNANI; CHEN; BARR; QUON, 2001; ZENG; NYSTROM; RAVICHANDRAN; CONG *et al.*, 2000). Contudo, apenas o aumento da fosforilação da ser1177 é pouco eficaz para produção de NO, resultando em um efeito vasodilatador pequeno, como é o caso da vasodilatação induzida pela insulina, que atinge um efeito máximo de aproximadamente 20-30% (FLEMING; FISSLTHALER; DIMMELER; KEMP *et al.*, 2001). Tal fato pode ser explicado pela baixa eficiência da transferência de elétrons entre os domínios reductase e oxidase da eNOS apenas pela fosforilação da ser1177 (FLEMING; FISSLTHALER; DIMMELER; KEMP *et al.*, 2001). Para que haja efetivo fluxo eletrônico e consequente produção de NO em grandes quantidades, é essencial que haja ligação do complexo Ca^{2+} -calmodulina em região contendo o aminoácido treonina na posição 495 (thr495) (FLEMING; FISSLTHALER; DIMMELER; KEMP *et al.*, 2001). O resíduo Thr495 representa um sítio regulatório inibitório, que se encontra predominantemente fosforilado em condições basais. A fosforilação nesse local reduz a afinidade da eNOS pela calmodulina, prejudica sua dimerização e culmina em diminuição da atividade enzimática como descrito em células endoteliais aórticas suínas e BAECs (FLEMING; FISSLTHALER; DIMMELER; KEMP *et al.*, 2001; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; LIN; FULTON; BABBITT; FLEMING *et al.*, 2003; RAMADOSS; PASTORE; MAGNESS, 2013). Desta forma, mais importante do que a fosforilação de ser1177, a fosforilação em thr495 é predominante para determinação de níveis de NO suficientemente altos para induzir relaxamento da musculatura lisa vascular.

Vários estudos descrevem a via das MAP quinases, particularmente a ERK1/2, como um regulador crucial da fosforilação no sítio inibitório Thr495 da eNOS, resultando na inibição da atividade da enzima e redução da produção de NO endotelial. Este mecanismo, é particularmente relevante em contextos de estresse oxidativo e baixo estresse de cisalhamento, condições associadas à disfunção endotelial e doenças cardiovasculares (FLEMING; FISSLTHALER; DIMMELER; KEMP *et al.*, 2001; KONG; QU; LI; WANG *et al.*, 2017). Testamos, então, a hipótese de que a ativação do TLR4 pelo LPS induziria a ativação da ERK, culminando no aumento da fosforilação da eNOS (Thr495) e consequente redução da biodisponibilidade de NO.

Assim como amplamente descrito na literatura, empregamos o PD98059 — um inibidor seletivo de MEK1/2 originalmente caracterizado por Dudley *et al.* (1995) e Alessi *et al.* (1995)

— como ferramenta farmacológica para bloquear especificamente a ativação da via ERK1/2 (ALESSI; CUENDA; COHEN; DUDLEY *et al.*, 1995; DUDLEY; PANG; DECKER; BRIDGES *et al.*, 1995). Notavelmente, o tratamento com PD98059 não alterou a contratilidade basal em preparações controle, mas restaurou significativamente o efeito anticontrátil do PVAT na presença de LPS (**Figura 13**). Este resultado sugere fortemente que a via ERK1/2 media a disfunção do PVAT induzida pela ativação aguda do receptor TLR4 pelo LPS.

Para determinar se a restauração funcional observada estava associada a uma restauração da biodisponibilidade de NO, quantificamos os níveis de NO utilizando a sonda fluorescente DAF-FM. A inibição da ERK com PD98059 não modulou os níveis de NO em aortas sem PVAT, tratadas ou não com LPS por 30 minutos (**Figura 14**). No entanto, de forma notável, o PD98059 restaurou os níveis de NO produzidos pelo PVAT tratados com LPS por 30 minutos a níveis comparáveis aos do grupo controle (**Figura 15**).

A ativação funcional da eNOS depende do equilíbrio entre fosforilação em resíduos estimulatórios (Ser1177) e inibitórios (Thr495), os quais são dinamicamente modulados por redes coordenadas de quinases e fosfatases. Após a exposição ao LPS, a expressão e a fosforilação da eNOS foram avaliadas na presença do inibidor seletivo de MEK1/2, PD98059. Inicialmente, confirmamos que o estímulo agudo com LPS não modificou a expressão total da eNOS no endotélio e no PVAT (**Figura 16** e **Figura 17**), indicando que a modulação observada ocorre predominantemente em nível pós-traducional, sem alterar a expressão total da enzima. Observou-se ainda que o tratamento com PD98059 não alterou a fosforilação em Ser1177, tanto em células endoteliais (**Figura 18**) quanto no PVAT (**Figura 19**), sugerindo que, neste contexto, a via ERK1/2 não exerce influência significativa sobre este sítio ativador da enzima. Em contraste, o PD98059 reverteu completamente o aumento da fosforilação induzido pelo LPS no resíduo Thr495 — conhecido como alvo preferencial da ERK1/2 — sem afetar os níveis basais, tanto em células endoteliais (**Figura 20**) quanto no PVAT (**Figura 21**). Esses achados indicam que a ativação da via ERK1/2 é necessária para a fosforilação inibitória da eNOS induzida por LPS.

Nesse contexto, nossos resultados demonstram que a ativação da ERK1/2 é um evento central na sinalização induzida por TLR4 que compromete a biodisponibilidade de NO no PVAT. O fato do PD98059 restaurar a produção de NO sugere que o PVAT é particularmente

sensível à sinalização via ERK1/2, configurando esta via como alvo para preservar a função anticontrátil do tecido.

A associação entre TLR4, ativação de MAPKs, disfunção endotelial e inflamação vascular já foi documentada no endotélio (CHRESTENSEN; MCMURRY; SALERNO, 2012; GRYLLS; SEIDLER; NEIL, 2021). Contudo, trabalhamos em condições de ativação aguda do receptor. A grande maioria dos trabalhos descreve os processos de disfunção endotelial relacionados a inflamação como consequência da ativação de vias de transcrição relacionadas ao TLR4. Não há dados precisos sobre o papel não inflamatório do TLR4 nas células endoteliais. Nossos achados expandem, ainda, esse paradigma para a vasorregulação dependente de PVAT. Coletivamente, nossos dados identificam a via TLR4–ERK1/2 como regulador crítico da função anticontrátil do PVAT mediada por eNOS, fornecendo um mecanismo molecular para explicar a perda do efeito anticontrátil do PVAT no nosso modelo.

Como relatado anteriormente, o LPS ativa a via de sinalização das MAPKs, promovendo a fosforilação da ERK1/2 (p-ERK), mecanismo descrito em modelos de endotoxemia e inflamação vascular (LIU; SUN; HU; LIU *et al.*, 2020). Em conformidade com esses achados, observamos que o estímulo com LPS aumentou significativamente a fosforilação da ERK1/2 tanto nas aortas quanto no PVAT, efeito completamente prevenido pelo inibidor específico de MEK1/2, PD98059 (**Figura 22A e 22B**). A convergência entre a ativação de ERK1/2 e o aumento concomitante da fosforilação inibitória da eNOS em Thr495 (**Figura 20 e Figura 21**) sugere que a via LPS–TLR4–ERK atua como eixo central de supressão da atividade da eNOS e conseqüentemente, da produção de NO no PVAT, em concordância com estudos que demonstram que a ERK1/2 promove fosforilação negativa da eNOS nesse mesmo resíduo em células endoteliais da veia umbilical humana e reduzindo a afinidade pela calmodulina e conseqüentemente, a atividade enzimática (FLEMING; FISSLTHALER; DIMMELER; KEMP *et al.*, 2001; GUTERBAUM; BRAUNSTEIN; FOSSUM; HOLSTEIN-RATHLOU *et al.*, 2013; KONG; QU; LI; WANG *et al.*, 2017).

Essa modulação negativa da eNOS provavelmente compromete a capacidade do PVAT de exercer sua função anticontrátil sobre a camada média vascular, favorecendo uma resposta hipercontrátil ao estímulo vasoconstritor. De forma consistente, como relatado anteriormente, o bloqueio farmacológico da via ERK1/2 com PD98059 restaurou o efeito anticontrátil do

PVAT (**Figura 13**), indicando que a ativação precoce de ERK1/2 é um evento determinante para a disfunção do tecido adiposo perivascular induzida pela ativação rápida do receptor TLR4-/- . Esse achado reforça a ideia de que a sinalização MAPK, tradicionalmente associada à inflamação e remodelamento vascular (MOENS; KOSTENKO; SVEINBJØRNSSON, 2013; WANG; LIU; LIU, 2025), também exerce papel direto na regulação aguda do tônus vascular por meio da modulação da interação do endotélio, do músculo liso e do tecido adiposo perivascular.

Diversos estudos indicam que a redução da biodisponibilidade de NO em condições inflamatórias ou metabólicas não decorre apenas da diminuição da sua síntese, mas também do seu consumo por reações com espécies reativas de oxigênio, especialmente o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante com efeitos citotóxicos (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007)

Para investigar se o comprometimento da sinalização via NO observado em nosso modelo poderia estar relacionado ao aumento da produção de radicais superóxido, avaliamos a fluorescência de DHE em cortes de aorta na presença e ausência do PVAT (**Figura 24 e Figura 25**). Além disso, empregamos o tiron — um sequestrador clássico de $O_2^{\bullet-}$ (SAN WONG; ROBERTS; RANDALL, 2015) — nos ensaios de reatividade vascular, com o objetivo de determinar se a remoção desses radicais seria capaz de restaurar o efeito anticontrátil mediado pelo PVAT (**Figura 23**)

Em nossas preparações, observamos aumento da fluorescência do dihidroetídio (DHE) após exposição ao LPS, indicando maior produção de espécies reativas. A inibição da via MEK/ERK com PD98059 reduziu significativamente a fluorescência de DHE (**Figura 24 e Figura 25**). Gao 2006 também mostrou que o PVAT aumenta a resposta contrátil arterial à estimulação do nervo perivascular por meio da produção de superóxido mediada pela NAD(P)H oxidase, e que esse aumento envolve a ativação da tirosina quinase e da via MAPK/ERK (GAO; TAKEMORI; SU; AN *et al.*, 2006). Esses achados sugerem que a fonte de espécies reativas de oxigênio detectada pelo DHE encontra-se sob regulação da via ERK (ex.: NADPH oxidase), diminuindo a produção na origem.

O Tiron (4,5-di-hidroxi-1,3-benzenodissulfonato de sódio) é reconhecido na literatura como um antioxidante sintético com duplo mecanismo de ação: atua como sequestrador potente do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e como agente quelante de íons ferricos (Fe^{3+}) impedindo a formação do radical hidroxila ($\cdot OH$), através da reação de Fenton (TAIWO, 2008). Nossos resultados revelam efeitos complexos e contexto dependentes deste composto na regulação do tônus vascular, particularmente na presença do tecido adiposo perivascular (PVAT).

Em vasos controle com PVAT, observamos que o Tiron promoveu um aumento significativo da contratilidade, um fenômeno previamente descrito por outros pesquisadores (**Figura 23**) (DA COSTA; FAIS; DECHANDT; LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 2017). Este efeito paradoxal para um agente antioxidante poderia ser explicado pela interferência do Tiron nos mecanismos de sinalização redox fisiológica do PVAT. Sabe-se que em condições fisiológicas, o PVAT libera fatores de relaxamento derivados do adipócito, entre os quais o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) emerge como um importante mediador promovendo vasodilatação e contribuindo para o efeito anti-contrátil característico do PVAT saudável (DA COSTA; FAIS; DECHANDT; LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 2017; GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2005). O H_2O_2 atua como molécula sinalizadora, promovendo a hiperpolarização e o relaxamento das células do músculo liso vascular através da ativação de canais de potássio e da estimulação da bomba de sódio-potássio (AHMED; BIBI; VALOTI; FUSI, 2023). A ação do Tiron como sequestrador do $O_2^{\cdot-}$ pode privar o sistema da matéria-prima essencial para a geração de H_2O_2 via superóxido dismutase. Desta forma, ao reduzir a disponibilidade de H_2O_2 , o Tiron remove um componente crucial do efeito anti-contrátil mediado pelo PVAT, resultando em um aumento da contratilidade vascular. Este mecanismo é consistente com observações da literatura em que a remoção física do PVAT ou a inibição farmacológica do H_2O_2 com catalase reproduzem este fenômeno de potencialização da contratilidade (DA COSTA; FAIS; DECHANDT; LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 2017).

Um resultado ainda mais revelador em nosso estudo foi a incapacidade do Tiron em reverter a hipercontratilidade induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (**Figura 23**), apesar do aumento significativo da fluorescência por DHE (di-hidroetídio) nos vasos tratados com LPS (**Figura 24** e **Figura 25**), que confirma a produção elevada de espécies reativas de oxigênio neste modelo. Esta observação sugere que a fisiopatologia induzida pelo LPS envolve mecanismos adicionais além do aumento de ROS passível de modulação pelo Tiron.

Embora o Tiron seja eficaz em reduzir níveis basais de $O_2^{\bullet-}$, ele não interfere nas vias de sinalização inflamatória downstream ativadas pelo LPS, nem neutraliza outras espécies reativas como o peroxinitrito ($ONOO^-$) formado pela reação entre óxido nítrico e superóxido (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Em conclusão, nossos resultados demonstram que a modulação do tônus vascular por antioxidantes como o Tiron é altamente dependente do contexto fisiopatológico. A ausência de reversão completa do fenótipo anticontrátil pelo tiron indica que, embora o estresse oxidativo contribua para a disfunção observada, outros mecanismos independentes de $O_2^{\bullet-}$ também podem estar envolvidos, relacionados à ativação de vias inflamatórias intracelulares como TLR4–ERK1/2.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram que o agonismo agudo do TLR4 com o LPS suprime o efeito anticontrátil mediado pelo tecido adiposo perivascular (PVAT). Este achado evidencia o papel essencial do TLR4 na manutenção da homeostase vascular através da regulação de fatores derivados do PVAT.

Verificamos que a ativação da via ERK1/2 é um evento central na sinalização do TLR4, levando à fosforilação inibitória da eNOS no resíduo inibitório Thr495 e, conseqüentemente, à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) principalmente no PVAT.

Em conjunto, os nossos dados identificam o eixo TLR4–ERK1/2–eNOS como um mecanismo crítico para a disfunção do PVAT induzida pelo agonismo agudo do receptor TLR4. Este eixo molecular explica como a ativação do TLR4 suprime a função da eNOS, comprometendo a modulação anticontrátil do PVAT e a homeostase vascular.

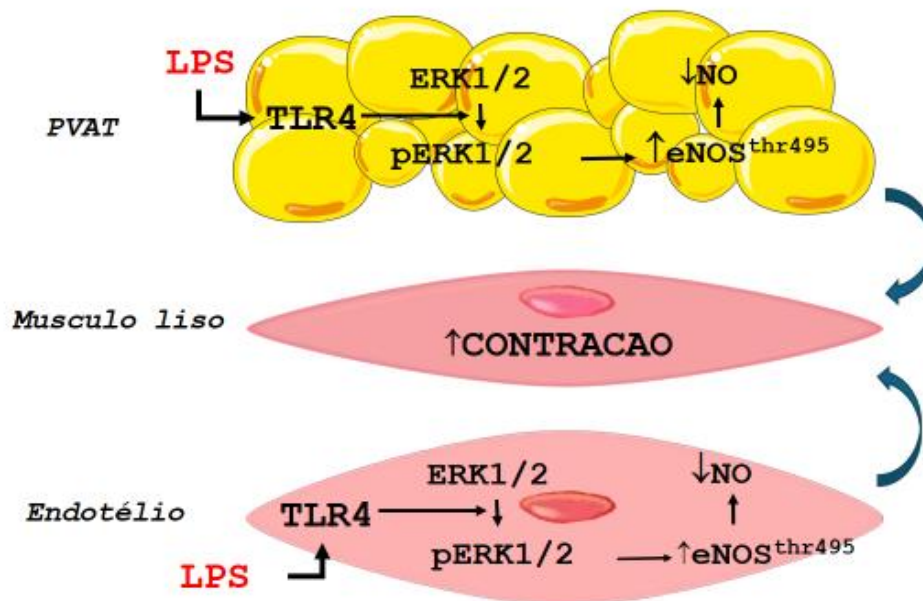


Figura 26. Mecanismo proposto da Disfunção do PVAT induzida pela ativação aguda do receptor TLR4. A ativação aguda do TLR4 pelo LPS em aortas desencadeia uma cascata de sinalização no endotélio e no PVAT, caracterizada inicialmente pelo aumento da fosforilação da ERK1/2 em seu sítio ativador Thr177. A ativação dessa via promove maior fosforilação inibitória da eNOS no resíduo Thr495, reduzindo a produção de NO e levando à perda do efeito anticontrátil do PVAT. Como consequência funcional, observa-se maior contração do músculo liso vascular.

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; BIBI, A.; VALOTI, M.; FUSI, F. Perivascular adipose tissue and vascular smooth muscle tone: friends or foes? **Cells**, 12, n. 8, p. 1196, 2023.
- AKCABAG, E.; BAYRAM, Z.; KUCUKCETIN, I. O.; UZUN, G. *et al.* Functional effects of visfatin in isolated rat mesenteric small resistance arteries. **European journal of pharmacology**, 908, p. 174333, 2021.
- ALESSI, D. R.; CUENDA, A.; COHEN, P.; DUDLEY, D. T. *et al.* PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, 270, n. 46, p. 27489-27494, 1995.
- ANDRABI, S. M.; SHARMA, N. S.; KARAN, A.; SHAHRIAR, S. S. *et al.* Nitric oxide: physiological functions, delivery, and biomedical applications. **Advanced Science**, 10, n. 30, p. 2303259, 2023.
- BATTY, M.; BENNETT, M. R.; YU, E. The role of oxidative stress in atherosclerosis. **Cells**, 11, n. 23, p. 3843, 2022.
- BERNIER, S. G.; HALDAR, S.; MICHEL, T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, 275, n. 39, p. 30707-30715, 2000.
- CAO, G.; XUAN, X.; HU, J.; ZHANG, R. *et al.* How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease. **Cell Communication and Signaling**, 20, n. 1, p. 180, 2022.
- CAPETTINI, L. S.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **European journal of pharmacology**, 643, n. 2-3, p. 260-266, 2010.
- CHENG, C. K.; DING, H.; JIANG, M.; YIN, H. *et al.* Perivascular adipose tissue: Fine-tuner of vascular redox status and inflammation. **Redox Biology**, 62, p. 102683, 2023.
- CHOY, K. W.; LAU, Y. S.; MURUGAN, D.; VANHOUTTE, P. M. *et al.* Paeonol attenuates LPS-induced endothelial dysfunction and apoptosis by inhibiting BMP4 and TLR4 signaling simultaneously but independently. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 364, n. 3, p. 420-432, 2018.
- CHRESTENSEN, C. A.; MCMURRY, J. L.; SALERNO, J. C. MAP kinases bind endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Open Bio**, 2, p. 51-55, 2012.
- CINELLI, M. A.; DO, H. T.; MILEY, G. P.; SILVERMAN, R. B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal research reviews**, 40, n. 1, p. 158-189, 2020.
- DA COSTA, R. M.; FAIS, R. S.; DECHANDT, C. R.; LOUZADA-JUNIOR, P. *et al.* Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular

adipose tissue in high-fat diet obese mice. **British Journal of Pharmacology**, 174, n. 20, p. 3527-3541, 2017.

DALY, C. J. Examining vascular structure and function using confocal microscopy and 3D imaging techniques. *In: Biomedical Visualisation: Volume 1*: Springer, 2019. p. 97-106.

DAUPHINEE, S. M.; KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Laboratory investigation**, 86, n. 1, p. 9-22, 2006.

DE OLIVEIRA, A. A.; FAUSTINO, J.; WEBB, R. C.; NUNES, K. P. Blockade of the TLR4–MD2 complex lowers blood pressure and improves vascular function in a murine model of type 1 diabetes. **Scientific Reports**, 10, n. 1, p. 12032, 2020.

DE OLIVEIRA, A. A.; NUNES, K. P. Crosstalk of TLR4, vascular NADPH oxidase, and COVID-19 in diabetes: What are the potential implications? **Vascular Pharmacology**, 139, p. 106879, 2021.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, 399, n. 6736, p. 601-605, 1999.

DROŹDŹ, D.; DROŹDŹ, M.; WÓJCIK, M. Endothelial dysfunction as a factor leading to arterial hypertension. **Pediatric Nephrology**, 38, n. 9, p. 2973-2985, 2023.

DUDLEY, D. T.; PANG, L.; DECKER, S. J.; BRIDGES, A. J. *et al.* A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92, n. 17, p. 7686-7689, 1995.

FERDINANDY, P.; SCHULZ, R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. **British journal of pharmacology**, 138, n. 4, p. 532-543, 2003.

FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; DIMMELER, S.; KEMP, B. E. *et al.* Phosphorylation of Thr495 regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circulation research**, 88, n. 11, p. e68-e75, 2001.

FOOTE, C. A.; SOARES, R. N.; RAMIREZ-PEREZ, F. I.; GHIARONE, T. *et al.* Endothelial glycocalyx. **Comprehensive physiology**, 12, n. 4, p. 3781-3811, 2022.

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

FULTON, D. Transcriptional and posttranslational regulation of eNOS in the endothelium. *In: Advances in Pharmacology*: Elsevier, 2016. v. 77, p. 29-64.

GAO, Y.-J.; TAKEMORI, K.; SU, L.-Y.; AN, W.-S. *et al.* Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. **Cardiovascular research**, 71, n. 2, p. 363-373, 2006.

GAO, Y. J.; LU, C.; SU, L. Y.; SHARMA, A. *et al.* Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **British journal of pharmacology**, 151, n. 3, p. 323-331, 2007.

GARCIA, V.; SESSA, W. C. Endothelial NOS: perspective and recent developments. **British journal of pharmacology**, 176, n. 2, p. 189-196, 2019.

GERICKE, A.; SNIATECKI, J. J.; MAYER, V. G.; GOLOBORODKO, E. *et al.* Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 300, n. 5, p. H1602-H1608, 2011.

GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. **Vascular pharmacology**, 43, n. 2, p. 128-138, 2005.

GIMBRONE JR, M. A.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. **Circulation research**, 118, n. 4, p. 620-636, 2016.

GRYLLS, A.; SEIDLER, K.; NEIL, J. Link between microbiota and hypertension: Focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics. **Biomed Pharmacother**, 137, n. 111334, p. 10.1016, 2021.

GUTERBAUM, T. J.; BRAUNSTEIN, T. H.; FOSSUM, A.; HOLSTEIN-RATHLOU, N.-H. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation at threonine 495 and mitochondrial reactive oxygen species formation in response to a high H₂O₂ concentration. **Journal of vascular research**, 50, n. 5, p. 410-420, 2013.

HARRINGTON, L. S.; LUNDBERG, M. H.; WAIGHT, M.; ROZARIO, A. *et al.* Reduced endothelial dependent vasodilation in vessels from TLR4^{-/-} mice is associated with increased superoxide generation. **Biochemical and biophysical research communications**, 408, n. 4, p. 511-515, 2011.

HE, Z.; CHEN, X.; WANG, S.; ZOU, Z. Toll-like receptor 4 monoclonal antibody attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 8, n. 3, p. 871-876, 2014.

HILLOCK-WATLING, C.; GOTLIEB, A. I. The pathobiology of perivascular adipose tissue (PVAT), the fourth layer of the blood vessel wall. **Cardiovascular Pathology**, 61, p. 107459, 2022.

HOGNOGI, L. D. M.; SIMITI, L. V. The cardiovascular impact of visfatin-an inflammation predictor biomarker in metabolic syndrome. **Clujul Medical**, 89, n. 3, p. 322, 2016.

HU, D.; SHEEJA PRABHAKARAN, H.; ZHANG, Y.-Y.; LUO, G. *et al.* Mitochondrial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic perspectives. **Critical care**, 28, n. 1, p. 292, 2024.

HU, S.; PI, Q.; XU, X.; YAN, J. *et al.* Disrupted eNOS activity and expression account for vasodilator dysfunction in different stage of sepsis. **Life Sciences**, 264, p. 118606, 2021.

HUANG, J.-B.; CHEN, Z.-R.; YANG, S.-L.; HONG, F.-F. Nitric oxide synthases in rheumatoid arthritis. **Molecules**, 28, n. 11, p. 4414, 2023.

HUANG, T. Y.; CHU, T. F.; CHEN, H. I.; JEN, C. J. Heterogeneity of $[Ca^{2+}]_i$ signaling in intact rat aortic endothelium. **The FASEB Journal**, 14, n. 5, p. 797-804, 2000.

HWEJ, A.; AL-FERJANI, A.; ALSHUWEISHI, Y.; NAJI, A. *et al.* Lack of AMP-activated protein kinase- α 1 reduces nitric oxide synthesis in thoracic aorta perivascular adipose tissue. **Vascular Pharmacology**, 157, p. 107437, 2024.

JEON, D.; KIM, S. J.; KIM, H. S. Anti-inflammatory evaluation of the methanolic extract of *Taraxacum officinale* in LPS-stimulated human umbilical vein endothelial cells. **BMC complementary and alternative medicine**, 17, p. 1-10, 2017.

JIN, M.; FANG, J.; WANG, J.-j.; SHAO, X. *et al.* Regulation of toll-like receptor (TLR) signaling pathways in atherosclerosis: from mechanisms to targeted therapeutics. **Acta Pharmacologica Sinica**, 44, n. 12, p. 2358-2375, 2023.

KIM, F.; PHAM, M.; LUTTRELL, I.; BANNERMAN, D. D. *et al.* Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. **Circulation research**, 100, n. 11, p. 1589-1596, 2007.

KIM, H. W.; SHI, H.; WINKLER, M. A.; LEE, R. *et al.* Perivascular adipose tissue and vascular perturbation/atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 40, n. 11, p. 2569-2576, 2020.

KONG, X.; QU, X.; LI, B.; WANG, Z. *et al.* Modulation of low shear stress-induced eNOS multi-site phosphorylation and nitric oxide production via protein kinase and ERK1/2 signaling. **Molecular Medicine Reports**, 15, n. 2, p. 908-914, 2017.

KUZMICH, N. N.; SIVAK, K. V.; CHUBAREV, V. N.; POROZOV, Y. B. *et al.* TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. **Vaccines**, 5, n. 4, p. 34, 2017.

LAMBDEN, S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis—an update. **Intensive care medicine experimental**, 7, n. 1, p. 64, 2019.

LEE, R. M.; LU, C.; SU, L.-Y.; GAO, Y.-J. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. **Journal of hypertension**, 27, n. 4, p. 782-790, 2009.

LI, X.-D.; HONG, M.-N.; CHEN, J.; LU, Y.-Y. *et al.* Adventitial fibroblast-derived vascular endothelial growth factor promotes vasa vasorum-associated neointima formation and macrophage recruitment. **Cardiovascular Research**, 116, n. 3, p. 708-720, 2020.

LIANG, C.-F.; LIU, J. T.; WANG, Y.; XU, A. *et al.* Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 33, n. 4, p. 777-784, 2013.

LIN, M. I.; FULTON, D.; BABBITT, R.; FLEMING, I. *et al.* Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to

efficient nitric oxide production. **Journal of biological chemistry**, 278, n. 45, p. 44719-44726, 2003.

LIU, Y.; SUN, Y.; HU, C.; LIU, J. *et al.* Perivascular adipose tissue as an indication, contributor to, and therapeutic target for atherosclerosis. **Frontiers in Physiology**, 11, p. 615503, 2020.

LÖHN, M.; DUBROVSKA, G.; LAUTERBACH, B.; LUFT, F. C. *et al.* Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **The FASEB Journal**, 16, n. 9, p. 1057-1063, 2002.

LUO, M.; LUO, S.; CHENG, Z.; YANG, X. *et al.* Tubeimoside I improves survival of mice in sepsis by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 126, p. 110083, 2020.

MA, J.; LI, Y.; YANG, X.; LIU, K. *et al.* Signaling pathways in vascular function and hypertension: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Signal transduction and targeted therapy**, 8, n. 1, p. 168, 2023.

MAKÓ, V.; CZÚCZ, J.; WEISZHÁR, Z.; HERCZENIK, E. *et al.* Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. **Cytometry Part A**, 77, n. 10, p. 962-970, 2010.

MAN, A. W.; ZHOU, Y.; XIA, N.; LI, H. Perivascular adipose tissue as a target for antioxidant therapy for cardiovascular complications. **Antioxidants**, 9, n. 7, p. 574, 2020.

MAWANDJI, N. B. d. S.; LISBOA, N. A. d. S.; GOMES, K. N.; VIEIRA, J. M. *et al.* Chronic Copper Overload Triggers Inflammation in Mesenteric PVAT Alongside Changes in Renin-Angiotensin System-Related Pathways. **Nutrients**, 17, n. 13, p. 2082, 2025.

MOENS, U.; KOSTENKO, S.; SVEINBJØRNSSON, B. The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases (MAPKAPKs) in inflammation. **Genes**, 4, n. 2, p. 101-133, 2013.

MOLTENI, M.; GEMMA, S.; ROSSETTI, C. The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. **Mediators of inflammation**, 2016, n. 1, p. 6978936, 2016.

MONTAGNANI, M.; CHEN, H.; BARR, V. A.; QUON, M. J. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser1179. **Journal of Biological Chemistry**, 276, n. 32, p. 30392-30398, 2001.

MOUNT, P. F.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 42, n. 2, p. 271-279, 2007.

NAVIA-PELAEZ, J. M.; CAMPOS, G. P.; ARAUJO-SOUZA, J. C.; STERGIOPULOS, N. *et al.* Modulation of nNOSser852 phosphorylation and translocation by PKA/PP1 pathway in endothelial cells. **Nitric Oxide**, 72, p. 52-58, 2018.

NAVIA-PELAEZ, J. M.; DIAS, M. T. S.; ORELLANO, L. A. A.; CAMPOS, G. P. *et al.* Dual effect of amitriptyline in the control of vascular tone: Direct blockade of calcium channel in

smooth muscle cells and reduction of TLR4-dependent NO production in endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, 934, p. 175255, 2022.

NOSALSKI, R.; GUZIK, T. J. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. **British journal of pharmacology**, 174, n. 20, p. 3496-3513, 2017.

OK, C. Y.; PARK, S.; JANG, H.-O.; BAE, M.-K. *et al.* Involvement of the visfatin/toll-like receptor 4 signaling axis in human dental pulp cell senescence: Protection via toll-like receptor 4 blockade. **Journal of Dental Sciences**, 18, n. 3, p. 1177-1188, 2023.

OLEJNIK, J.; HUME, A. J.; MÜHLBERGER, E. Toll-like receptor 4 in acute viral infection: Too much of a good thing. **PLoS pathogens**, 14, n. 12, p. e1007390, 2018.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, 2007.

PAHWA, R.; NALLASAMY, P.; JIALAL, I. Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial cell inflammation and perturbation of the endothelial glycocalyx. **Journal of diabetes and its complications**, 30, n. 4, p. 563-572, 2016.

PARK, B. S.; LEE, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & molecular medicine**, 45, n. 12, p. e66-e66, 2013.

PAUTZ, A.; LI, H.; KLEINERT, H. Regulation of NOS expression in vascular diseases. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, 26, n. 5, p. 85-101, 2021.

PFEIFFER, S.; LEOPOLD, E.; SCHMIDT, K.; BRUNNER, F. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. **British journal of pharmacology**, 118, n. 6, p. 1433-1440, 1996.

QI, X.-Y.; QU, S.-L.; XIONG, W.-H.; ROM, O. *et al.* Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword. **Cardiovascular diabetology**, 17, p. 1-20, 2018.

RAMADOSS, J.; PASTORE, M. B.; MAGNESS, R. R. Endothelial caveolar subcellular domain regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 40, n. 11, p. 753-764, 2013.

RENOVATO-MARTINS, M.; MOREIRA-NUNES, C.; ATELLA, G. C.; BARJA-FIDALGO, C. *et al.* Obese adipose tissue secretion induces inflammation in preadipocytes: role of toll-like receptor-4. **Nutrients**, 12, n. 9, p. 2828, 2020.

ROMERIO, A.; PERI, F. Increasing the chemical variety of small-molecule-based TLR4 modulators: an overview. **Frontiers in immunology**, 11, p. 1210, 2020.

SAMUEL, O. O. Review on multifaceted involvement of perivascular adipose tissue in vascular pathology. **Cardiovascular Pathology: the Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology**, 49, p. 107259-107259, 2020.

SAN WONG, P.; ROBERTS, R. E.; RANDALL, M. D. Hyperoxic gassing with Tiron enhances bradykinin-induced endothelium-dependent and EDH-type relaxation through generation of hydrogen peroxide. **Pharmacological Research**, 91, p. 29-35, 2015.

SANDER, M.; CHAVOSHAN, B.; VICTOR, R. G. A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. **Hypertension**, 33, n. 4, p. 937-942, 1999.

SAXTON, S. N.; CLARK, B. J.; WITHERS, S. B.; ERINGA, E. C. *et al.* Mechanistic links between obesity, diabetes, and blood pressure: role of perivascular adipose tissue. **Physiological reviews**, 99, n. 4, p. 1701-1763, 2019.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I. *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **The Journal of clinical investigation**, 116, n. 11, p. 3015-3025, 2006.

SHIMOKAWA, H.; GODO, S. Diverse functions of endothelial NO synthases system: NO and EDH. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 67, n. 5, p. 361-366, 2016.

SOLONE, X. K.; CALDARA, A. L.; WELLS, B.; QIAO, H. *et al.* MAP kinases differentially bind and phosphorylate NOS3 via two unique NOS3 sites. **FEBS Open bio**, 12, n. 5, p. 1075-1086, 2022.

SONOBE, T.; KAKINUMA, Y. Non-neuronal cell-derived acetylcholine, a key modulator of the vascular endothelial function in health and disease. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 11, p. 1388528, 2024.

STARK, R.; CHOI, H.; KOCH, S.; LAMB, F. *et al.* Monophosphoryl lipid A inhibits the cytokine response of endothelial cells challenged with LPS. **Innate immunity**, 21, n. 6, p. 565-574, 2015.

STARK, R. J.; KOCH, S. R.; CHOI, H.; MACE, E. H. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase modulates Toll-like receptor 4-mediated IL-6 production and permeability via nitric oxide-independent signaling. **The FASEB Journal**, 32, n. 2, p. 945, 2017.

STENMARK, K. R.; YEAGER, M. E.; EL KASMI, K. C.; NOZIK-GRAYCK, E. *et al.* The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. **Annual review of physiology**, 75, n. 1, p. 23-47, 2013.

TAIWO, F. A. Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. **Journal of spectroscopy**, 22, n. 6, p. 491-498, 2008.

TINAJERO, M. G.; GOTLIEB, A. I. Recent developments in vascular adventitial pathobiology: the dynamic adventitia as a complex regulator of vascular disease. **The American journal of pathology**, 190, n. 3, p. 520-534, 2020.

TORAL, M.; ROMERO, M.; JIMÉNEZ, R.; ROBLES-VERA, I. *et al.* Role of UCP2 in the protective effects of PPAR β/δ activation on lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction. **Biochemical pharmacology**, 110, p. 25-36, 2016.

TRAN, N.; GARCIA, T.; ANIQA, M.; ALI, S. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the cardiovascular system: in physiology and in disease states. **American journal of biomedical science & research**, 15, n. 2, p. 153, 2022.

VANHOUTTE, P. M.; ZHAO, Y.; XU, A.; LEUNG, S. W. Thirty years of saying NO: sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator. **Circulation research**, 119, n. 2, p. 375-396, 2016.

VICTORIO, J. A.; FONTES, M. T.; ROSSONI, L. V.; DAVEL, A. P. Different anti-contractile function and nitric oxide production of thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **Frontiers in physiology**, 7, p. 295, 2016.

WANG, M.; FENG, J.; ZHOU, D.; WANG, J. Bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial activation and dysfunction: a new predictive and therapeutic paradigm for sepsis. **European Journal of Medical Research**, 28, n. 1, p. 339, 2023.

WANG, X.; HE, B. Endothelial dysfunction: Molecular mechanisms and clinical implications. **MedComm**, 5, n. 8, p. e651, 2024.

WANG, X.; LIU, R.; LIU, D. The role of the MAPK signaling pathway in cardiovascular disease: pathophysiological mechanisms and clinical therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, 26, n. 6, p. 2667, 2025.

WANG, Z.; ZHANG, J.; LI, B.; GAO, X. *et al.* Resveratrol ameliorates low shear stress-induced oxidative stress by suppressing ERK/eNOS-Thr495 in endothelial cells. **Molecular medicine reports**, 10, n. 4, p. 1964-1972, 2014.

WEISS, G.; GOOSSEN, B.; DOPPLER, W.; FUCHS, D. *et al.* Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. **The EMBO journal**, 12, n. 9, p. 3651-3657, 1993.

WORKMAN, A. D.; CAREY, R. M.; KOHANSKI, M. A.; KENNEDY, D. W. *et al.*, 2017, **Relative susceptibility of airway organisms to antimicrobial effects of nitric oxide**. Wiley Online Library. 770-776.

XIA, N.; HORKE, S.; HABERMEIER, A.; CLOSS, E. I. *et al.* Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in perivascular adipose tissue of diet-induced obese mice. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 36, n. 1, p. 78-85, 2016.

XIAO, K.; ZHAO, F.; XIE, W.; DING, J. *et al.* Mechanism of TLR4 mediated immune effect in transfusion-induced acute lung injury based on Slit2/Robo4 signaling pathway. **Transfusion and Apheresis Science**, 62, n. 1, p. 103500, 2023.

YAMASHITA, T.; KAWASHIMA, S.; OHASHI, Y.; OZAKI, M. *et al.* Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**, 101, n. 8, p. 931-937, 2000.

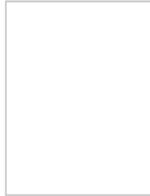
YAZJI, I.; SODHI, C. P.; LEE, E. K.; GOOD, M. *et al.* Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS–NO–nitrite signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110, n. 23, p. 9451-9456, 2013.

ZENG, G.; NYSTROM, F. H.; RAVICHANDRAN, L. V.; CONG, L.-N. *et al.* Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. **Circulation**, 101, n. 13, p. 1539-1545, 2000.

ZHANG, F.; GUO, X.; XIA, Y.; MAO, L. An update on the phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of atherosclerosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 79, n. 1, p. 6, 2022.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of pharmacological sciences**, 129, n. 2, p. 83-94, 2015.

ZHU, Z.; PENG, X.; LI, X.; TU, T. *et al.* HMGB1 impairs endothelium-dependent relaxation in diabetes through TLR4/eNOS pathway. **The FASEB Journal**, 34, n. 6, p. 8641-8652, 2020.

ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 311/2022

Título do projeto: POTENCIAL USO DA AMITRIPTILINA NO TRATAMENTO DA DOENÇA ATEROSCLEROTICA VIA ANTAGONISMO DE TLR4: PAPEL DA nNOS

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Luciano dos Santos Aggum Capettini

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 06/02/2023. Validade: 06/02/2023 à 05/04/2028.
Belo Horizonte, 06/02/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516

www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br