Juliana María Navia Pélaez
Orientador: Luciano Dos Santos Aggum Capettini

Ativação da nNOS pela via PKA/PP1 : Implicações na captação de LDL oxidada via Toll Like Receptor 4

Belo Horizonte - Brasil

Março 2018

Juliana María Navia Pélaez
Orientador: Luciano Dos Santos Aggum Capettini

Ativação da nNOS pela via PKA/PP1 : Implicações na captação de LDL oxidada via Toll Like Receptor 4

Trabalho de doutorado apresentado para título de doutor do programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia

Belo Horizonte - Brasil
Março 2018

043 Pélaez, Juliana María Navia.
Ativação da nNOS pela via PKA/PP1: Implicações na captação de LDL oxidada via Toll Like Receptor 4 [manuscrito] / Juliana María Navia Pélaez. – 2018.

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

Orientador: Luciano dos Santos Aggum Capettini.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Farmacologia - Teses. 2. Aterosclerose - Teses. 3. Óxido Nítrico Sintase. 4. Estresse oxidativo - Teses. 5. Lipoproteínas LDL. I. Capettini, Luciano dos Santos Aggum. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

"ATIVAÇÃO DA NNOS PELA VIA PKA/PP1: IMPLICAÇÕES NA CAPTAÇÃO DE LDL OXIDADA VIA TOLL LIKE RECEPTOR 4"

JULIANA MARIA NAVIA PELAEZ

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **27 de março de 2018**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. GERSON JHONATAN RODRIGUES
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROFA. DRª. LUCIANA DE OLIVEIRA ANDRADE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROFA. DRª. SONIA JANCAR NEGRO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROF. DR. STÉFANY BRUNO DE ASSIS CAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 27 de março de 2018

à meus pais e irmãs,
incluindo você Gi

Island where all becomes clear.
Solid ground beneath your feet.
The only roads are those that offer access.
Bushes bend beneath the weight of proofs.
The Tree of Valid Supposition grows here with branches disentangled since time immemorial.
The Tree of Understanding, dazzlingly straight and simple, sprouts by the spring called Now I Get It.
The thicker the woods, the vaster the vista: the Valley of Obviously.
If any doubts arise, the wind dispels them instantly.
Echoes stir unsummoned and eagerly explain all the secrets of the worlds.
On the right a cave where Meaning lies.
On the left the Lake of Deep Conviction. Truth breaks from the bottom and bobs to the surface.
Unshakable Confidence towers over the valley. Its peak offers an excellent view of the Essence of Things.
For all its charms, the island is uninhabited, and the faint footprints scattered on its beaches turn without exception to the sea.
As if all you can do here is leave and plunge, never to return, into the depths.

Into unfathomable life.

Utopia
Wislawa Szymborska

Agradecimentos

À UFMG e ao programa de pós-graduação pela oportunidade e formação. Ao CNPq e outras agencias de fomento pelo apoio financeiro, com o qual foi possível desenvolver este projeto.

Ao meu orientador, guia e amigo, Luciano Capettini, agradeço a confiança em mim depositada e o suporte em todos os momentos durante o doutorado. Palavras são poucas, que possam expressar o carinho e gratidão.

Às facilidades multi-usuário da universidade: O centro de citometria e a técnica Daniela Reis pelo suporte e colaboração; Ao biotério do departamento de Farmacologia; e ao CAPI, por disponibilizar ferramentas fundamentais para completar os experimentos.

Aos professores Evanguedes e Jader, por disponibilizar parte da infraestrutura do seus laboratórios.

À prof. Jacqueline Alvarez-Leite, pela continua colaboração com material, estrutura e sobretudo discussão. Aos demais integrantes do LABIN em particular o Weslley, pela colaboração.

À prof. Luciana Andrade pelos aportes ao trabalho e à sua aluna Natalia Couto pela ajuda com os experimentos envolvendo a polimerização e rearranjos de actina.

Ao prof. Andre Klein, por nos acolher e dar a mão no laboratório e seminários.

Aos colegas de laboratório, departamento e outros pela ajuda, discussões e amizade. Ao Edenil pelo exemplo de rigor científico e às ICs pelo suporte. E em especial à Gi, pela parceria, colaborarão, discussão, guia e incondicional amizade. Esse trabalho também é dela.

A mis padres y hermanas por celebrar los triunfos y animar los tropiezos, y al Wil por ser apoyo y compañero.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Modulação da captação de LDLox pela nNOS em macrófagos 36
Figura 2 – Participação da nNOS na captação rápida de LDLox em macrófagos . . 37
Figura 3 – Participação dos produtos da nNOS na captação rápida de LDLox em macrófagos 38
Figura 4 – Modulação da captação rápida de LDLox pelo NO em macrófagos . . . 39
Figura 5 – Modulação da captação rápida de LDLox pelo H_2O_2 em macrófagos . . 39
Figura 6 – Biodisponibilidade de NO durante a exposição rápida à LDLox em macrófagos 40
Figura 7 – Expressão proteica da NADPH - subunidade p67 em resposta à LDLox em macrófagos 41
Figura 8 – Produção de NO em resposta à LDLox na presença de SOD em macrófagos 42
Figura 9 – Modulação da captação rápida de LDLox pela SOD em macrófagos . . 42
Figura 10 – Atividade da nNOS durante a captação de LDLox em macrófagos . . . 43
Figura 11 – Participação dos receptores CD36 na captação rápida de LDLox em macrófagos 45
Figura 12 – Participação dos receptores PAF na captação rápida de LDLox em macrófagos 46
Figura 13 – Modulação da captação de LDLox pela nNOS via TLR4 e TLR2 47
Figura 14 – Modulação da captação de LDLox pela nNOS via TLR4 em macrófagos 48
Figura 15 – Modulação da captação de LDLox pelos produtos da nNOS via TLR4 . 49
Figura 16 – Participação do TLR4 na captação rápida de LDLox em macrófagos . . 50
Figura 17 – Participação do TLR4 na captação rápida de LDLox ao longo de 1 hora 51
Figura 18 – Participação do receptor TLR2 na captação aguda de LDLox em macrófagos 51
Figura 19 – Papel da ERK e JNK na captação rápida de LDLox em macrófagos . . 52
Figura 20 – Captação rápida de LDLox via macropinocitose em macrófagos 53
Figura 21 – Polimerização e rearranjos de actina durante exposição à LDLox em macrófagos 54
Figura 22 – Participação do TLR4 na produção rápida de NO em macrófagos . . . 55
Figura 23 – Participação do TLR4 na ativação da nNOS em macrófagos 56
Figura 24 – Participação da PKA na produção de NO e na captação de LDLox em macrófagos 57
Figura 25 – Mobilização do cálcio durante a captação de LDLox em macrófagos . . 58
Figura 26 – participação da PKA na ativação da nNOS em macrófagos 59
Figura 27 – Translocação da PP1 dependente da PKA em macrófagos 60
Figura 28 – Superpossicão de nNOS e TLR4 62

Figura 30 – Independência do TLR4 do CD36 63
Figura 29 – Co-Imunoprecipitação do TLR4 e a nNOS. 63
Figura 31 – nNOS na função vascular 64
Figura 32 – Atividade da nNOS em células endoteliais e anéis de aorta 65
Figura 33 – Participação da PP1 na ativação da nNOSno endotélio 66
Figura 34 – Ativação e translocação da PP1 em células endoteliais 67
Figura 35 – Participação da PKA na Ativação da nNOS e da PP1 em células endoteliais 68
Figura 36 – Participação da PKA na translocação da nNOS 69
Figura 37 – Via de ativação da nNOS pelo TLR4 76
Figura 38 – Via de ativação da nNOS no endotélio 80

Lista de abreviaturas e siglas

ADMA	Asymmetric dimethylarginine
AM	Amitriptilina
ARH	*Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1* - Proteína adaptadora do receptor de LDL
apoE	Apoliproteina E
CaMKII	Proteína Quinase dependente de calcio/Calmodulina II
CCL-2	*Monocyte chemoattractant protein-1* - Proteína quimioatratora de monócitos 1
CD36	*Cluster of differentiation 36* - Cluster de diferenciação 36
eNOS	*endothelial Nitric Oxide Synthase* - Oxido Nítrico Sintase endotelial
ERK1/2	*extracellular signal–regulated kinases* - Proteína quinase regulada por sinais extracelulares
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
HUVEC	*Human Umbilical Vein Endothelial cells* - células endoteliais da veia umbilical humana
ICAM-1	*Intercellular Adhesion Molecule 1* - Molécula de adesão intercelular-1
INB1	*Inhibitor 1* - Inibidor 1
iNOS	*induced Nitric Oxide Synthase* - Oxido Nítrico Sintase induzível
IRAK-4	*IL-1 Receptor associated Kinase-4* - receptor de IL-1 associado à quinase 4
IRFs	*Interferon regulatory factors* - Fatores Reguladores de Interferon
JNK1/2	Quinase c-Jun N-terminal
LaT A	Latrunculina A
LDL	*Low density lipoprotein* - Lipo proteína de baixa densidade
LDLox	*Oxidized LDL* - LDL oxidada

L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester
L-NIO	N5-(1-iminoethyl)-L-ornithine, dihydrochloride
LOX-1	*Lectin-like oxidized LDL receptor-1* - Receptor para LDL oxidada semelhante à lecitina
LPB	*LPS binding protein* - Proteína de união ao LPS
LPS	Lipopolisacarideos
MAPKs	*Mitogen-Activated Protein Kinases* - proteína quinase ativada por mitógenos
MD2	Proteína de união ao domínio extracelular de TLR4
MyD88	*Myeloid differentiation primary response 88* - fator de diferenciação mielóide 88
NFKB	Fator nuclear κappa B
NIPP1	*Nuclear Inhibitor of PP1* - Inibidor nuclear da PP1
NMDA	N-metil D-Aspartato
nNOS	*neuronal Nitric Oxide Synthase* - Oxido Nítrico Sintase neuronal
NPA	Nω-propyl-L-Arginine
NO	*Nitric Oxide* - Oxido Nítrico
NOx2	NADPH Oxidase 2
ODN-AS	*Anti-sense oligodeoxynucleotides* - Oligonucleotideos anti-sentido
PAFR	*Platelet-activating factor receptor* - Receptor para o fator ativador de plaquetas (PAF)
PKA	Proteína Quinase dependente de AMPc
PKC	Proteína Quinase C
PLC	fosfolipase C
PP1	*Protein Phosphatase 1* - Proteína Fosfatase 1
PP2A	*Protein Phosphatase 2 A* - Proteína Fosfatase 2 A
ROS	*Reactive Oxigen Species* - Especies reativas de Oxigênio

SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine
SOD	Superóxido Dismutase
sPLA2	fosfolipase A2
SR-A	*Scavenger receptors type A* - Receptor Scavenger tipo A
TANK	*TRAF familly member-associated NF-KB activator* - Quinase ligadora de ativador NF-kB associada à membro da família TRAF
TBK1	*TANK biding kinase 1* - Quinase de união à TANK 1
TLR4	*Toll Like Receptor 4* - Receptor do tipo TOLL 4
TRAF6	*TNF receptor associated factor 6* - fator associado ao receptor de TNF
TRIF	*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β* - Domínio TIR contendo adaptador indutor de IFN-β
TRIM	1-(2- trifluoromethylphenyl) imidazole
VCAM-1	*Vascular cell adhesion molecule 1* - Molécula de adesão celular-vascular-1

Resumo

A nNOS tem sido apontada como um fator atero-protetor e sua atividade encontra-se comprometida na hiperlipidemia. No entanto, não é conhecida alguma relação entre os receptores que reconhecem a LDL modificada nos macrófagos com a atividade da nNOS. Assim, neste trabalho avaliamos o papel do NO derivado da nNOS na captação de LDLox e sua relação com a ativação e via de sinalização dos receptores TLR4. Para tal, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6J e $TLR4^{-/-}$ foram estimulados com LDLox conjugada com FITC por 1h, na presença ou ausência de inibidor da nNOS e/ou amitriptilina (AM; antagonista dos receptores TLR2/4), SNAP(doador de NO) ou H_2O_2. A LDLox-FITC foi visualizada por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. A produção de NO e superóxido e o influxo de cálcio foi avaliada com as sondas DAF–FM, DHE, Fluo-4 e Fluo-5N. A ativação da nNOS no endotélio foi avaliada em células endoteliais e anéis de aorta estimulados com acetilcolina(Ach). Observou-se que a inibição da nNOS aumentou a captação de LDLox em macrófagos e o doador de NO a diminuiu. Estes efeitos não foram observados quando inibida a polimerização de actina. Além disso, o aumento na captação pela inibição da nNOS foi abolido em animais $TLR4^{-/-}$ e nas células tratadas com AM. Este tratamento, assim como a inibição da nNOS, diminuiu a produção de NO. Os níveis de fosforilação da nNOS (Ser852-inativação) diminuíram ao longo da exposição à LDLox e aumentaram em células $TLR4^{-/-}$ e tratadas com AM. Por outro lado, o estímulo com LDLox levou a liberação de cálcio do retículo de forma dependente do TLR4 pela via da PLC e PKA. A inibição da PKA aumentou a captação de LDLox e diminuiu a produção de NO. Adicionalmente, a inibição da PKA aumentou a fosforilação da nNOS-Ser852 e impediu a translocação de PP1 para o citoplasma. Em células endoteliais e anéis de aorta foi observado desfosforilação do resíduo ser852 pela Acetilcolina. Anéis de aorta silenciados para eNOS mostraram inibição da resposta à acetilcolina quando inibida a PP1. Adicionalmente, evidenciou-se desligamento da PP1 do inibidor endógeno NIPP1 e subsequente translocação ao citoplasma. A estimulação com o análogo do cAMP mimetizou a ativação pela Acetilcolina, e a inibição da PKA impediu a desfosforilação da nNOS-Ser852 e impediu a translocação da PP1. Consequentemente, concluímos que a ativação da nNOS ocorre por um mecanismo dependente da PKA e PP1. Em macrófagos , esta via é induzida pelo estímulo do TLR4 em resposta à LDLox resultando em liberação de NO que possivelmente regula a macropinocitose impedindo ainda maior captação de LDLox.

Abstract

nNOS has been described as atheroprotective and its activity is compromised in hyperlipidemia. However, there is no known relationship of receptors recognizing modified LDL in macrophages and nNOS activity. in this work we evaluated the role of nNOS-derived NO in the uptake of oxLDL and its relation to the activation of TLR4 receptors. Therefore, peritoneal macrophages of C57BL/6J and $TLR4^{-/-}$ mice were stimulated for 1h with FITC-conjugated oxLDL in the presence or absence of nNOS inhibitor, amitriptyline (AM, TLR2/4 receptor antagonist), SNAP (NO donor) or H2O2. FITC-oxLDL was visualized by fluorescence microscopy and cytometry. production of NO and superoxide and calcium influx were evaluated by DAF-FM, DHE, Fluo-4 and Fluo-5N probes. Activation of endothelial nNOS was evaluated in acetylcholine-stimulated endothelial cells and aortic rings. it was observed that inhibition of nNOS increased the uptake of oxLDL in macrophages and that NO donor decreased it. these effects were not observed when polymerization of actin was inhibited. In addition, increased uptake by nNOS inhibition was abolished in $TLR4^{-/-}$ animals and AM-treated cells. this treatment, as well as inhibition of nNOS, decreased NO production. The phosphorylation levels of nNOS (Ser852-inactivation) decreased throughout oxLDL exposure and increased in $TLR4^{-/-}$ cells and AM-treated cells. On the other hand, oxLDL stimulation led to the release of calcium from the reticulum and calcium influx dependent on TLR4, PLC and PKA. inhibition of PKA increased LDLox uptake and decreased NO production. In addition, it increased the phosphorylation of nNOS-Ser852 and prevented the translocation of PP1 into the cytoplasm. in endothelial cells and aortic rings dephosphorylation of the ser 852 residue by Ach was observed. silenced aorta rings for eNOS showed inhibition of the acetylcholine response when PP1 was inhibited. In addition, PP1 deattachment of the endogenous NIPP1 inhibitor and subsequent cytoplasmic translocation were evidenced. cAMP analogue stimulation mimicked Ach activation, and inhibition of PKA prevented the dephosphorylation of nNOS-Ser852 and prevented PP1 translocation. Consequently, we conclude that the activation of nNOS occurs by a mechanism dependent on PKA and PP1. in macrophages, this pathway is induced by TLR4 stimulation in response to oxLDL resulting in NO release that possibly regulates macropinocytosis, preventing further oxLDL uptake.

Sumário

AGRADECIMENTOS **4**

RESUMO **10**

ABSTRACT **11**

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA **15**

2 REVISÃO DA LITERATURA **17**

2.1 Papel da LDLox na Aterosclerose **17**

2.1.1 nNOS e Aterosclerose 17

2.1.2 TLRs e Aterosclerose 18

2.2 Reconhecimento e Captação de LDLox **19**

2.2.1 TLR4 e acúmulo de LDLox 20

2.2.2 Óxido Nítrico e Regulação da Captação 21

2.3 Sinalização do TLR4 . . . . . **22**

2.4 Ativação da nNOS **24**

2.5 Objetivos **26**

2.5.1 **Objetivos Específicos** 26

3 MATERIAIS E MÉTODOS **27**

3.1 Cuidados Éticos **27**

3.2 Captação de LDLox em macrófagos peritoneais **27**

3.2.1 Isolamento de Macrófagos peritoneais de camundongos 27

3.2.2 Obtenção e oxidação da LDL 27

3.2.3 Conjugação da LDL oxidada com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) . . . 28

3.2.4 Exposição de Macrófagos à LDL oxidada 28

3.2.5 Avaliação da captação da LDLox por fluorescência 28

3.3 Cultura de células endoteliais humanas **30**

3.3.1 Estimulação de células endoteliais com Acetilcolina 30

3.4 Imunolocalização de proteínas por microscopia de fluorescência . . . **30**

3.4.1 Analise de colocalização do TLR4 e nNOS 31

3.4.2 Analise de rearranjos e polimerização de actina 31

3.5 Expressão e fosforilação proteica por Western-blot **31**

3.6 Avaliação de Interação proteica por Co-imunoprecipitacão **32**

3.7 Medidas da produção de NO, Superoxido e mobilização de Ca2+ por citometria de fluxo **33**

3.8 Reatividade vascular para análise da função endotelial . . . 34
3.8.1 Silenciamento agudo da eNOS em camundongos pelo uso de Oligodeoxynucleotidos anti-sence (AS-ODN) . . . 34
3.9 Análises estatísticas . . . 35

4 RESULTADOS . . . 36
4.1 Regulação da captação de LDLox pela nNOS . . . 36
4.1.1 Papel da nNOS sobre a captação rápida de LDLox por macrófagos . . . 37
4.1.2 Efeito dos produtos da nNOS sobre a captação rápida de LDLox em macrófagos 37
4.1.3 Biodisponibilidade de NO durante a exposição rápida à LDLox em macrófagos 40
4.1.3.1 Possíveis fontes de superóxido durante o processo de captação . . . 40
4.1.3.2 Efeito da conversão do superóxido na captação de LDLox em macrófagos . . . 41
4.1.4 Ativação da nNOS em macrófagos . . . 43
4.2 Modulação dos receptores *scavenger* pela nNOS . . . 44
4.2.1 Modulação dos receptores *scavenger* pela nNOS na captação rápida de LDLox 44
4.2.2 Participação do TLR4 na captação rápida da LDLox . . . 46
4.2.3 Mecanismo de regulação da captação via TLR4 pela nNOS . . . 52
4.2.3.1 Captação via Macropinocitose . . . 53
4.3 Ativação rápida da nNOS via TLR4 . . . 54
4.3.0.1 Efeito do antagonismo ou deficiência do TLR4 na produção de NO . . . 54
4.3.0.2 Efeito do antagonismo ou deficiência do TLR4 na ativação da nNOS . . . 55
4.4 Vias envolvidas na ativação da nNOS pelos TLR4 em macrófagos . 56
4.4.1 Principais vias na produção de NO e captação . . . 56
4.4.2 Papel do cálcio na internalização e sinalização do TLR4 . . . 57
4.4.3 Participação da PKA na ativação da nNOS em macrófagos . . . 59
4.4.4 Participação da PP1 na ativação da nNOS . . . 59
4.4.5 *Crosstalk* entre TLR4 e nNOS . . . 60
4.4.6 Colocalização da nNOS e TLR4 . . . 61
4.4.7 Interação física nNOS-TLR4 . . . 62
4.5 Mecanismo de Ativação da nNOS no endotélio . . . 63
4.5.1 nNOS na função vascular . . . 64
4.5.2 Participação da PP1 na ativação e translocação da nNOS . . . 65
4.5.3 Participação da PKA na sinalização . . . 67

5 DISCUSSÃO . . . 70
5.1 Ativacão da nNOS pelo TLR4 na regulação da captação de LDLox em macrófagos . . . 70
5.2 Mecanismo de ativação da nNOS no endotélio . . . 77

Considerações finais . . . 81

REFERÊNCIAS 82

Anexos 99

1 Introdução e Justificativa

A aterosclerose, doença de alta mortalidade no mundo (234 mortes/100,000 habitantes segundo a Organização Mundial da Saúde) (BARQUERA et al., 2015), inicia-se com elevação dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) circulante. A migração e oxidação de LDL no espaço subendotelial dos vasos, bem como a interação da LDL oxidada (LDLox) com macrófagos residentes, desencadeia o processo inflamatório e de formação de células espumosas determinantes para o desenvolvimento da aterosclerose (MAIOLINO et al., 2013). Vários receptores da resposta inata presentes nas membranas dos macrófagos apresentam alta afinidade por fosfolipídeos oxidados presentes na LDL oxidada (LDLox) e são responsáveis pelo reconhecimento e captação destes epítopos oxidados que, em condições patológicas, geram uma resposta de inflamação estéril crônica. Do conjunto dos receptores, o SR-A1, CD36 e LOX-1 são considerados os responsáveis pela maior parte da captação da LDLox e vários trabalhos mostram sua participação na formação de placa (THORNE et al., 2007)(SUZUKI et al., 1997)(SHEEDY et al., 2013) (MIETUS-SNYDER; GOWRI; PITAS, 2000). Foi sugerido recentemente que os receptores tipo TOLL (TLR) também reconhecem e respondem a LDLox, desencadeando respostas inflamatórias clássicas e não clássicas via TLR4 (STEWART et al., 2010)(PLOCIENNIKOWSKA et al., 2015)(MILLER et al., 2009). Trabalhos sugerem ainda que a sinalização decorrente da ativação destes receptores acelera o desenvolvimento do processo aterosclerótico (MICHELSEN et al., 2004)(LU et al., 2013). Estes estudos indicam a importância da participação de outros receptores não clássicos na captação da LDLox e na resposta aterogênica induzida por eles (RIOS; GIDLUND; JANCAR, 2011) .

Por outro lado, é conhecido que a nNOS (isoforma neuronal da óxido nítrico sintase) é uma enzima importante na via fisiológica de controle da função e homeostase vascular através da síntese de NO e H_2O_2, e que sua redução está associada à disfunção endotelial e estresse oxidativo que precede a formação da placa aterosclerótica (CAPETTINI et al., 2011). Além de evidencias mostrando que a deleção da nNOS aumenta a formação de placa e a progressão de formação neointima (HUANG et al., 1994)(KUHLENCORDT et al., 2006)(MORISHITA et al., 2002), trabalhos mostram que a ativação de receptores LOX e receptor CD36 podem modular a via de síntese de NO produzido no endotélio (COMINACINI et al., 2001)(ISENBERG et al., 2007). Trabalhos sugerem ainda que estes receptores podem se associar ao receptor TLR após reconhecimento de LDLox e modular a resposta imune (TRIANTAFILOU et al., 2006); (CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 2014). No entanto, não são conhecidos os mecanismos envolvidos no possível *crosstalk* entre as vias de captação de LDLox e as vias de síntese de NO. Além disso, não se conhece o real papel modulatório do NO sobre a captação de LDLox pelos receptores supracitados em

macrófagos.

Apesar de ser muito estudado o papel dos diversos receptores scavenger na captação a longo prazo de LDLox, poucos trabalhos demonstram as vias de sinalização ativadas imediatamente após a ligação da LDLox a estes receptores. Desta forma, se fazem importantes estudos dos eventos pré-transcricionais frente ao estímulo celular com a LDLox para identificação de novos alvos terapêuticos moleculares. Elucidando a participação dos receptores TLR4 na captação de LDLox em macrófagos e a relação com a via de sinalização da nNOS e os produtos sintetizados por esta, será possível entender qual é o mecanismo de ativação da LDLox na resposta inata celular rápida e quais são os mediadores críticos na via que podem ser novos alvos terapêuticos no tratamento, não só da aterosclerose, mas também de outras doenças de fisiopatologia similar.

Além disso, elucidar possíveis mecanismos de ativação da nNOS tanto em macrófagos como no endotélio, é de utilidade no entendimento da participação desta enzima na biologia Vascular.

2 Revisão da Literatura

2.1 Papel da LDLox na Aterosclerose

A aterosclerose pode ser considerada uma forma de inflamação crônica resultante da interação entre lipoproteínas modificadas oxidativamente, macrófagos e células T. Tal resposta inflamatória ocorre em estímulo à presença de um padrão molecular de dano, sendo esse frequentemente as lipoproteínas de baixa densidade (low density lipoprotein - LDL) na sua forma oxidada (LIBBY, 2002) .
Concentrações elevadas de LDL na corrente sanguínea aumentam sua migração por entre as células endoteliais e a interação com proteoglicanos da matriz subendotelial resultando na retenção destas. A ação de espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos residentes, células musculares lisas e células endoteliais leva à oxidação e aprisionamento das LDL (STEFFENS; MACH, 2004). As LDL oxidadas estimulam a síntese de moléculas quimiotáticas para monócitos (CCL2/ MCP-1) e a expressão de moléculas de adesão celular como P-Selectinas, VCAM-1 e ICAM-1. As moléculas CCL2, então, atraem os monócitos que se ligam às P-selectinas aumentando o rolamento e, por fim, se aderem firmemente às demais moléculas de adesão, levando à sua migração via endotélio para a camada íntima do vaso (MAIOLINO et al., 2013)(CASÓS et al., 2008). Os monócitos diferenciam-se, então, em macrófagos que expressam os receptores de reconhecimento de padrões, classicamente scavenger CD36 e SR-A, os quais ligam-se às LDL oxidadas e as fagocitam, levando à formação de células espumosas devido ao acúmulo de lipídeos dentro das células (KUNJATHOOR, 2002)(WEBB; MOORE, 2007). Este acumulo ocorre devido ao fato de que geralmente não há uma regulação negativa, ou seja, a expressão desses receptores não é regulada pelo conteúdo de partículas captadas. Por outro lado os mecanismos de exocitose destas partículas pela célula não são suficientes (MANNING-TOBIN et al., 2009)(CASTRILLO et al., 2003). A agregação destas lipoproteínas na íntima arterial tem sido proposta como sendo um evento primordial na aterosclerose (CASÓS et al., 2008) , (ROSENSON; SHOTT; TANGNEY, 2002) , (LIBBY, 2002) , (KHALIL; WAGNER; GOLDBERG, 2004) . Assim, dá-se início a formação da estria gordurosa, que constitui a primeira fase da lesão (HEGYI et al., 1996) .

2.1.1 nNOS e Aterosclerose

O estresse oxidativo está associado a várias doenças cardiovasculares (COMINACINI et al., 2001) , (HEISTAD, 2006) , (NAITO et al., 2010) . Na aterosclerose, desempenha um papel importante na resposta inflamatória e na disfunção endotelial, (HIGASHI et al., 2009) , (KONDO; HIROSE; KAGEYAMA, 2009) (LUDMER et al., 1986) . O Óxido nítrico (NO)

que é o principal produto das Óxido Nítrico Sintases (NOS), além de potente vasodilatador, apresenta uma série de ações anti-inflamatórias e anti-oxidantes em condições fisiológicas, prevenindo os estágios iniciais da aterosclerose. Desta forma, a inativação do NO pelos ânions superóxido levam à disfunção endotelial e favorece a entrada de mais vesículas de LDL e a oxidação destas (HEISTAD, 2006) .

Estudos mostram a presença da nNOS em células vasculares e do sistema imune (SCHODEL et al., 2009)(HUANG et al., 2012a)(CHOI et al., 2002). Além de participar na manutenção da homeostase vascular (CAPETTINI et al., 2008), alguns estudos apontam limitações às conclusões obtidas com o modelo duplo *knockout* $eNOS^{-/-}$ $apoE^{-/-}$, por demonstrar que há um aumento da expressão da nNOS nestes animais. Adicionalmente, estudos recentes sugerem um possível papel da nNOS como agente vasculo-protetor na aterosclerose, uma vez que a deleção gênica da nNOS acelera a formação de placa em animais $apoE^{-/-}$ (KUHLENCORDT et al., 2006) , (LOWENSTEIN, 2006) , (SCHODEL et al., 2009) . Também há evidências que mostram um aumento das formações neoíntimas em modelo de lesão de carótida em animais deficientes para nNOS (MORISHITA et al., 2002). Nosso grupo evidenciou que a via da nNOS encontra-se comprometida em aortas de camundongos $apoE^{-/-}$. Além disso, mostramos que estágios anteriores à formação de placa aterosclerótica, apresentam uma acentuada disfunção endotelial associada a uma diminuição de função, não só da eNOS, mas também da nNOS (CAPETTINI et al., 2011). Outros trabalhos mostraram ainda que a nNOS regula as interações leucócito-endotélio em animais $eNOS^{-/-}$ (SANZ et al., 2001). No entanto, apesar das várias evidências do papel vasculo-protetor da nNOS na aterosclerose em modelos animais, o papel da mesma no desenvolvimento da aterosclerose ao nível celular e molecular permanece desconhecido.

2.1.2 TLRs e Aterosclerose

A ativação do sistema imune e sinalização de vias inflamatórias em lesões ateroscleróticas é gerada pela exposição crônica à LDL oxidada (CURTISS; TOBIAS, 2009)(CHANG et al., 2004) (LOPES-VIRELLA; VIRELLA, 2013) . Além disso, estudos em modelos animais de hiperlipidemia têm mostrado redução na progressão da aterosclerose ao se controlar a inflamação (COLE; MITRA; MONACO, 2010) (BÄCK; HANSSON, 2015) . Estes resultados evidenciam a importância da participação do sistema imune como sensor de moléculas oxidadas e desencadeador de eventos inflamatórios crônicos na aterosclerose.

O reconhecimento da LDLox pelos macrófagos se dá através dos receptores scavenger e receptores clásicos na imunidade inata tipo Toll (TLRs). Os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos, como agentes microbianos, e são considerados importantes sensores de epítopos de oxidação específicos, reconhecidos como padrões moleculares associados a dano(TRIANTAFILOU et al., 2006). Vários trabalhos sugerem a participação destes receptores no aceleramento do processo aterosclerótico a longo prazo (FALCK-HANSEN;

KASSITERIDI; MONACO, 2013). Da grande família de receptores do tipo TOLL, os TLR2 e o TRL4 reconhecem lipoproteínas desacetiladas incluindo LDLox não associadas a patógenos (TRIANTAFILOU et al., 2006)(CHOI et al., 2009). Após interação com o ligante, estes receptores podem dimerizar formando homodimeros, heterodimeros do tipo TLR1/2, TLR2/6 e heterotrimeros do tipo TLR4/6/CD36 (COLE; MITRA; MONACO, 2010)(FANG et al., 2011), e internalizar ou sinalizar desde a membrana promovendo ativação de processos de inflamação estéril (STEWART et al., 2010).

Por outro lado, trabalhos mostram adesão monocítica e produção de IL-8 induzida por LDLox via TLR4 (WALTON et al., 2003), resposta endotelial pro-aterogênica à LDLox via TLR2 (WEST et al., 2010), assim como aceleração de agregação plaquetária e formação de trombos em animais $apoE^{-/-}$ dependente de TLR2 (BISWAS et al., 2016). Mullick e colaboradores mostraram expressão aumentada do TLR2 na superfície endotelial em áreas de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (MULLICK; TOBIAS; CURTISS, 2005). Este resultado foi confirmado por Higashimori que evidenciou menor formação de células espumosas em áreas de alto risco de lesão em animais $apoE - TLR2^{-/-}$ (HIGASHIMORI et al., 2011). Da mesma forma, Xu e colaboradores evidenciaram maior expressão do TLR4 em lesões ateroscleróticas humanas e de camundongos $apoE^{-/-}$ (XU et al., 2001). Camundongos $apoE - TLR4^{-/-}$ mostram uma área de lesão reduzida (MICHELSEN et al., 2004) e estudos clínicos mostram associação de polimorfismo no gene do TLR4 com eventos coronarianos agudos (AMEZIANE et al., 2003)(KIECHL et al., 2002). Em 2009, Choi e colaboradores mostraram evidência da contribuição do receptor TLR4 na formação de células espumosas (CHOI et al., 2009), e Higashimori sugere ainda que esta participação é maior que a do TLR2 (HIGASHIMORI et al., 2011). Além disso, a deleção do TLR2 e do TRL4 reduz a calcificação da neointima associada a aterosclerose induzida pela LDLox (SU et al., 2011). Assim, a literatura sugere que o bloqueio dos TLR2 e dos TRL4 pode reduzir formação da lesão e inflamação aterosclerótica (COLE; MITRA; MONACO, 2010)(LU et al., 2013)(LUCAS; MAES, 2013).

2.2 Reconhecimento e Captação de LDLox

A oxidação das moléculas de LDL leva à exposição de moléculas de fosforilcolina oxidada gerando um tipo de mimetismo molecular capaz de ativar o sistema imune e o consequente reconhecimento pelos receptores scavenger ou TLR dos macrófagos (BINDER; PAPAC-MILICEVIC; WITZTUM, 2016). Estes receptores medeiam a captação e fagocitose de moléculas alteradas oxidativamente detectando o acúmulo de epítopos oxidados no local, ativando vias de sinalização que incluem a secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias (MILLER et al., 2012)(CHANG et al., 2004)(CHOI et al., 2013), além da atenuação do efluxo de colesterol na célula (CASTRILLO et al., 2003). Assim, geram um acúmulo de colesterol nas células e desencadeiam os processos envolvidos na progressão da aterosclerose.

A geração de epítopos oxidados tem sido bem caracterizada por estudos da atividade biológica da LDLox (STEINBERG; WITZTUM, 2010)(BINDER; PAPAC-MILICEVIC; WITZTUM, 2016) (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010) (SALOMON, 2012). Os mecanismos pelos quais ocorre oxidação de lipídeos incluem vias enzimáticas e mecanismos não enzimáticos mediados por radicais livres (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). Ácidos graxos polinsaturados suscetíveis à oxidação (em particular a fosfatidilcolina) e os produtos da peroxidação destes, resultam em uma variedade de epítopos oxidados reconhecíveis pelos receptores na superfície dos macrófagos (BINDER; PAPAC-MILICEVIC; WITZTUM, 2016). Estudos confirmaram a ligação destes epítopos com os receptores através da cadeia truncada *sn2*Acyl (LI et al., 2007) ou a porção fosfocolina (PC) da LDLox (BOULLIER et al., 2005). Esta mesma porção parece mediar a captação via SRB1/LOX-1 (KUMANO-KURAMOCHI et al., 2012)(KUMANO-KURAMOCHI et al., 2013), e junto com outros epítopos oxidados, a captação ocorre via CD36 e via SRA1 e SRA2 (GREENBERG et al., 2006)(KIM et al., 2015)(SHECHTER et al., 1981) (DURYEE et al., 2005).

A fagocitose da LDLox após reconhecimento pelos receptores ocorre por um mecanismo dependente de actina e ATP e envolve formação de macropinosomos similares à pseudopodos, e é independente da clatrina, proteína associada a vesículas para endocitose clássica mediada por receptor (SCHRIJVERS et al., 2007). Após a fagocitose, a LDLox é apenas parcialmente degradada pelos lisossomos e, com isso, há acúmulo celular de LDLox e de colesterol. Quando a remoção do colesterol é limitada, seja pela quantidade alta de lipoproteína que entra ou pela capacidade limitada da célula de excretar o excesso, dá-se passo a transformação dos macrófagos em células espumosas (JESSUP; KRITHARIDES, 2000)(CASTRILLO et al., 2003).

2.2.1 TLR4 e acúmulo de LDLox

Estudos usando camundongos $apoE^{-/-}$ *knockout* para CD36 e SRA demostram que a captação via estes receptores é proaterogênica, como revisado por Webb & Moore (WEBB; MOORE, 2007). Contudo, experimentos avaliando o papel destes receptores na deposição de lipídeos na placa, nos mesmos modelos *knockout* para SR-A, CD36 ou CXCL16, têm reportado nenhum efeito ou inclusive um aumento da aterosclerose na ausência destes (MOORE et al., 2005) (WINTHER et al., 1999)(ASLANIAN; CHARO, 2006). Outros estudos sugerem que a internalização de lipídeos oxidados gerados pela fosfolipase A2 (sPLA2) é independente destes dois receptores (BOYANOVSKY; Van Der Westhuyzen; WEBB, 2005).Esses trabalhos sugerem envolvimento de outros receptores na captação, transdução de sinal e resposta celular à LDLox.

Por outro lado, trabalhos mostram que a LDLox e β-amieloides desencadeiam sinais inflamatórios através de heterodimeros de TLR4 e TLR6 regulados pelo CD36 (STEWART

et al., 2010)(JIN et al., 2011). Animais $apoE^{-/-}$ que expressam a quinase IRAK4 inativa (quinase importante na via de sinalização do TLR4) mostraram uma redução na infiltração de macrófagos e acúmulo de lipídeos em modelo de ligação de carótida (REKHTER et al., 2008). Adicionalmente, Imai e colaboradores, evidenciaram acúmulo de fosfolipídeos oxidados em lesões pulmonares estimuladas por patógenos e ativação de macrófagos via TLR4 induzida pelos fosfolipídeos oxidados 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine oxPAC (IMAI et al., 2008). Miller e colaboradores têm demostrado que a mmLDL (produto da oxidação parcial da LDL), ainda reconhecida pelos receptores da LDL mas não pelos scavenger, se liga especificamente ao CD14 (co-receptor do TLR4) e induz aumento da expressão do CD36 levando à aumento da captação de LDLox (MILLER et al., 2003). Trabalhos mais recentes evidenciaram que a mmLDL induz macropinositose dependente do TLR4 resultando em acúmulo de lipídeos (MILLER et al., 2009)(CHOI et al., 2009) e que esteres de colesterol oxidados (oxCE) induzem resposta inflamatória via TLR4/MD2 (CHOI et al., 2013). Estes trabalhos, junto com evidencias de homologia estrutural entre a proteína de união à LPS (LBP) e a proteína de transferência de esteres de colesterol (CETP), assim como entre a MD2, que liga LPS e a NCP2, que liga esteres de colesterol lisossomiais, suportam a ideia de reconhecimento e ligação de lipídeos oxidados ao TLR4 (LLOYD; BONNETTE; THOMPSON, 2006)(SHI; ZHONG; YU, 2012). Além disso, recentemente Chaves-Sanchez e colaboradores demostraram que o TLR4, mas não o TLR2, é importante na formação de células espumosas (CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 2014) e que o TLR4 é necessário para a captação eficiente de lipídeos por macrófagos (STOLETOV et al., 2009). Contudo, elucidar o papel do TLR4 e TLR2 e os mecanismos pelos quais eles participam na captação é ainda necessário.

2.2.2 Óxido Nítrico e Regulação da Captação

As LDLox constituem-se em um fator desencadeante para aumentar ainda mais a oxidação das LDL que migrarem para o sítio de início da lesão, sendo fagocitadas pelos macrófagos, promovendo a produção de ROS e a captação de mais partículas de LDL (MOORE; FREEMAN, 2006) , (MUDAU et al., 2012) , (GAO; GENG, 2013) . Assim, torna-se importante a manutenção dos níveis de NO para a homeostase vascular e menor oxidação e captação de LDL (AHMED et al., 2009).

A ativação dos receptores scavenger ou TLR por lipídeos modificados pode alterar a produção do NO. Trabalhos mostraram que dieta rica em gordura ou HDL modificada, reduzem a biodisponibilidade de NO endotelial via TLR2, levando a alterações no reparo endotelial e aumento da ativação proinflamatória (SPEER et al., 2013)(JANG et al., 2013). Por outro lado, Isemberg e colaboradores evidenciaram que a captação do ácido mirístico pelo CD36 ativa a via de sinalização da eNOS produzindo NO (ISENBERG et al., 2007).

O NO também tem sido envolvido na modulação de alguns receptores. Por exemplo, o

NO produzido endogenamente após estímulo por LPS ou liberado por meio de doadores químicos, regula os receptores de angiotensina II *in vitro* (ICHIKI et al., 1998) (LECLERC et al., 2006). Estes dados são confirmados por Bomfim e colaboradores, evidenciando que a ativação do TLR4 contribui no aumento da pressão, inflamação e participa na resposta contrátil aumentada em ratos espontaneamente hipertensos (BOMFIM et al., 2012). Trabalhos mostraram também que o NO pode modular a captação de 3H-Dopamina, diminuindo o transporte ao interior das células (POGUN; BAUMANN; KUHAR, 1994). Adicionalmente, foi demonstrado que a fosforilação da S1412 da nNOS pelo receptor NMDAR modula o tráfego do receptor AMPA via NO (RAMEAU et al., 2007). Por outro lado, ativação do receptor Fcγ por complexos imunes produz NO em poucas quantidades via nNOS que promove fagocitose de forma parácrina e autócrina (HUANG et al., 2012a).

Com relação a captação de LDL, estudos indicam que altas concentrações de estradiol aumentam a captação de LDL pela produção de NO derivado do endotélio (ROBERTS; WOO; RUTLEDGE, 1997). Zhao e colaboradores mostraram que o NO nitrosila ARH (proteína adaptadora do receptor de LDL) nos resíduos C199 e C286, e que estas modificações são necessárias para a associação do ARH com a proteína adaptadora 2 (AP-2), componente das invaginações revestidas de clatrina. Na ausência da nitrosilação, ARH não é capaz de levar à formação do complexo LDL-LDLR até as invaginações revestidas, resultando em pobre captação de LDL (ZHAO et al., 2013). Por outro lado, foi evidenciado que deficiência de NO, induzida por ADMA ou L-NAME, leva à aumento da expressão de mRNA e proteína do LOX-1 em HUVEC, que resulta em acumulação de oxLDL (SMIRNOVA; SAWAMURA; GOLIGORSKY, 2004). Assim evidencia-se os diferentes efeitos do NO sobre os mecanismos de captação de LDL e LDL oxidada e a necessidade de elucidar o papel do NO neste processo.

2.3 Sinalização do TLR4

Ativação clássica do TLR4 por LPS começa pela ligação do LPS ao CD14 ancorado em microdominios ricos em esfingolipídeos e colesterol na membrana celular (YU; WRIGHT, 1996). Após a ligação, o CD14 transfere o LPS para o complexo TLR4/MD-2 que ao dimerizar desencadeia produção de citocinas proinflamatórias dependente da proteína adaptadora MyD88; e produção de interferons tipo I dependente da proteína adaptadora TRIF (CALVANO et al., 2003). Esta última sinalização via TRIF esta associada com a endocitose do TLR4 e é controlada pelo CD14 (ZANONI et al., 2011).

A sinalização na membrana via MyD88 desencadeia a translocação e ativação de fatores de transcrição, entre eles o NFKB, AP-1 e IRFs, para o controle de expressão de citocinas proinflamatórias (BROWN et al., 2011). A MyD88 recruta e ativa a IRAK-4 que por sua vez ativa a proteína adaptadora TRAF6. A TRAF6 ativa a proteína quinase TAK1 que medeia a fosforilação do IKK levando a ativação do complexo NFκB. (SUN et al., 2004)(CHANG;

KARIN, 2001) (SUZUKI et al., 2002). Ativação da TAK1 também ativa MAPK quinases gerando ativação de ERK1/2, JNK1/2 e p38 MAPKs (PIMIENTA; PASCUAL, 2007) (ZOU; SHANKAR, 2015). Trabalhos mostram ainda que por mecanismos desconhecidos, a MyD88 gera ativação do IRF5 (TAKAOKA et al., 2005). O bloqueio desta via dependente do MyD88 nao abole totalmente a ativação do NFκB nem das MAPK (KAWAI et al., 1999). A ativação dessas quinases dá-se também pela ativação do TLR dependente de TRIF no endossomo após endocitose.

A TRIF, outra proteína adaptadora com o domínio TIR, tem um papel importante na ativação do fator de transcrição IRF3 e na ativação tardia de NF-κB e MAPK(LU; YEH; OHASHI, 2008). Ativação do NF-κB via TRIF depende da ligação da RIP1 (receptor-interacting protein 1) à região C-terminal da TRIF, ativando o complexo de IKKs e da mesma forma o complexo TAK1/TAB que leva a ativação tardia das MAPKs (YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2013)(CUSSON-HERMANCE et al., 2005)(CHANG; KARIN, 2001). A via da TRIF recruta a TRAF3, outra proteina adaptadora, que se liga à TANK (TRAF family mem- ber-associated NF-κB activator), TBK1 (TANK binding kinase 1) e IKKi para mediar a dimerização e translocação do IRF3 (FITZGERALD et al., 2003).

A mudança da via de sinalização dependente de MyD88 para a via do TRIF em endossomos não está bem esclarecida, mas estudos propõem que se dá pela depleção de PIP_2 da membrana do endossomo (LAIRD et al., 2009), alterando a ligação do MyD88 e TIRAP , e favorecendo a ligação do TRIF e TRAM. Alterações no PIP_2 são consequência da ativação da (PLCγ2) pelo CD14 via Syk quinases, gerando PIP_3 e subsequente liberação de cálcio intracelular, necessários para endocitose do receptor e ativação do IRF3 (CHIANG et al., 2012)(ZANONI et al., 2011).

Outros ligantes endógenos como a mmLDL, também tem mostrado induzir as mesmas vias para ativação de macrófagos (CHOI et al., 2009). Como revisado e detalhado por Miller e colaboradores, a ativação rápida da via TLR4/SYK por mmLDL junto com LPS, resulta em dimerização do TLR4 e ligação e fosforilação do SYK. Fosforilação da Syk, ativa por um lado, JNK e ERK1/2 que fosforilam os fatores de transcrição Jun e Fos, respectivamente, e formam o complexo AP-1 resultando em expressão de citocinas proinflamatorias (MILLER et al., 2012)(MÓCSAI; RULAND; TYBULEWICZ, 2010)(BERTON; MÓCSAI; LOWELL, 2005). Por outro lado, SYK ativa Vav1 gerando uma cascata de sinalização Ras-Raf-MEK1-ERK1/2 fosforilando paxillina e ativação do Rac e Cdc42, levando a rearranjos do citoesqueleto da membrana em macrófagos resultando em polimerização de filamentos de actina (MILLER et al., 2012). Além disso, Ativação da PLCγ2, e consequente ativação de PKC junto com ativação da Rac mediada pela ERK1/2, contribuem na geração de ROS no curto prazo, via NOX2 (BAE et al., 2009).

Quinases de vias paralelas podem ser ativadas pela ativação do TLR4. Por exemplo,

estimulação com LPS tem mostrado ativar a via da PI3K/AKT mudando o perfil de expressão de citocinas (GUHA; MACKMAN, 2002) (MARTIN et al., 2014). A PI3K também participa, junto com o Rho, no dobramento para fechamento de macropinosomas importantes na captura de fluido circundante (HAROKOPAKIS; HAJISHENGALLIS, 2005) . Por outro lado, outros receptores também ancorados nos microdominios ricos em colesterol como o CD36, podem se associar ao TLR4 funcionando como um co-receptor (COLE; MITRA; MONACO, 2010)(FANG et al., 2011). o CD36 gera fosforilação no resíduo Tyr436 do c-terminal e se associa com Lyn (associada também a receptores TLR) após reconhecimento de LDLox ou β-amieloide. Esta associação induz formação do complexo de heterodimeros do CD36, TLR4 e TLR6 e desencadeia ativação de inflamasoma e produção de mediadores proinflamatorios via sinalização dos TLR4/TLR6 (STEWART et al., 2010).

2.4 Ativação da nNOS

É bem descrito que ativação de macrófagos pelo LPS induz formação de óxido nítrico através de aumento da expressão da iNOS (isoforma não constitutiva e induzível da NOS). Ativação do TLR4 com LPS leva a indução de fatores de transcrição que após exposição ao estímulo leva de 3 a 6 horas para induzir aumento da expressão da enzima e produção de NO (XIE; KASHIWABARA; NATHAN, 1994) (JACOBS; IGNARRO, 2001) (MAO et al., 2013). Outros trabalhos evidenciaram o papel do TLR4 na ativação de outras isoformas como a endotelial (KIM et al., 2007). Contudo não existem trabalhos mostrando relação do TLR com ativação rápida das NOS nem com a ativação da isoforma neuronal. Além disso, o próprio mecanismo de ativação da nNOS não esta elucidado completamente.

Como a isoforma endotelial, a nNOS também é expressa constitutivamente e como descrito por Weissman e colaboradores em 2001, a ativação é dependente de cálcio. Weissman sugeriu 4 passos sequenciais: 1- ligação do cálcio ao c-lobe da calmodulina. 2- ligação da mesma porção do domínio da calmodulina à nNOS. 3- ligação do cálcio à porção n-lobe da calmodulina e 4- ligação do n-lobe ao domínio da calmodulina na nNOS, na região autoinibitoria. Já a desativação ocorreria na ordem contrária, após quelação do cálcio (WEISSMAN et al., 2002). Assim a calmodulina funciona alinhando adequadamente os domínios redutase e oxigênase adjacentes no dímero da nNOS para a transferência de elétrons entre eles, levando à síntese de NO (PANDA; GHOSH; STUEHR, 2001).

A atividade catalítica da nNOS pode ser regulada pela fosforilação de alguns resíduos dentro de elementos reguladores da enzima por várias quinases. Vários trabalhos mostraram modulação negativa da atividade da nNOS pela fosforilação do resíduo ser847 (ou Ser852, dependendo da espécie) pela proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK II) ao reduzir a ligação do complexo Cálcio/calmodulina (KOMEIMA et al., 2000) (HAYASHI et al., 1999). Defosforilação deste residuo pela proteína fosfatase 2 A (PP2A) recupera a atividade da enzima e produção de NO. A proteína fosfatase 1 (PP1) também pode

estar envolvida nesta ativação (RAMEAU; CHIU; ZIFF, 2003) (KOMEIMA et al., 2000). Trabalhos mostram que a CaMKI também inibe atividade da nNOS ao fosforilar o resíduo ser741 (SONG et al., 2004). Diferente da proteína quinase C(PKC), que aumenta a atividade de forma indireta por fosforilar proteínas desconhecidas que regulam a resposta ao cálcio da nNOS. (NAKANE et al., 1991).

Outro sitio de fosforilação da nNOS, é o resíduo Ser1412, análogo ao sitio de fosforilação presente na isoforma endotelial. Fosforilação deste resíduo aumenta atividade da nNOS, assim como desfosforilação por algumas fosfatases a reduz (ZHOU; ZHU, 2009). Trabalhos mostram que a via da PI3K/AKT fosforila de forma rápida este resíduo seguida por fosforilação do ser847 pela CamKII (RAMEAU et al., 2007). Ativação da nNOS pela via da PI3K/AKT também tem sido evidenciada em vários estudos (CUNHA et al., 2010) (GINGERICH; KRUKOFF, 2008) . Suficiente evidência existe mostrando indução de expressão proteica da nNOS pelas MAPK, p38, JNK e ERK (WANG; CHABOT; QUIRION, 2011) (KOMATSU et al., 2007) (NAKATA et al., 2005) mas pouca em relação a fosforilação deste sítio, embora algumas MAPK como a ERK podem fosforilá-lo (HUANG et al., 2012a). Por outro lado, além de trabalhos mostrando a indução da nNOS via proteína dependente de cAMP (PKA), vários trabalhos mais recentes mostram ativação do Ser1412 pela PKA induzindo ativação e produção de NO (YEN et al., 2011) (HURT; SEZEN, 2012)(OSUKA et al., 2013).

2.5 Objetivos

Avaliar os mecanismos envolvidos na captação e sinalização rápida da LDLox, bem como o papel dos receptores TLR4 neste processo e sua relação com a via de sinalização da nNOS como regulador do processo de captação em macrófagos murinos.

2.5.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar o papel da nNOS e seus produtos na captação de LDLox em macrófagos murinos.

2. Avaliar o mecanismo pelo qual a nNOS e seus produtos regulam a captação em macrófagos.

3. Avaliar isoladamente a participação dos receptores TLR4 na captação da LDLox em macrófagos e sua associação com a nNOS.

4. Avaliar os mediadores envolvidos na transdução de sinal induzida pela captação de LDLox via receptores TLR4 e sua relação coma a atividade da nNOS, bem como de algumas quinases e fosfatases envolvidas na via de ativação.

5. Validar o mecanismo de ativação da nNOS encontrado em macrófagos, em condições fisiológicas usando modelo de ativação endotelial.

3 Materiais e Métodos

3.1 Cuidados Éticos

O projeto desenvolvido foi submetido e aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob protocolo de número 423/2015.

3.2 Captação de LDLox em macrófagos peritoneais

3.2.1 Isolamento de Macrófagos peritoneais de camundongos

Usando uma agulha 25G foi injetado 1 ml de caldo tioglicolato estéril 6% no peritônio de animais C57/BL, $TLR4^{-/-}$, $TLR2^{-/-}$ e $TLR2/4^{-/-}$ e depois de 3 dias os animais foram submetidos a eutanásia. Após eutanásia, colocou-se o animal na câmara de fluxo laminar em decúbito dorsal sobre um tabuleiro revestido com um resguardo. Posteriormente, PBS estéril foi injetado na cavidade abdominal, de modo a não atingir nenhum órgão ou vaso sanguíneo, usando uma agulha 25G com o bisel virado para cima. Foi feita uma massagem abdominal durante 1 a 2 minutos para facilitar a deslocação dos macrófagos peritoneais para esta região. Após a massagem foi feita a colheita do líquido com seringas descartáveis de 10 ml com agulhas 19G . Centrifugou-se o líquido recolhido da cavidade peritoneal do camundongo durante 10 minutos a 1500 rpm a 4ºC. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido com a adição de meio de cultura (RPMI – completo com soro fetal bovino a 10%) para aderir em placa e/ou estimulação direta.

3.2.2 Obtenção e oxidação da LDL

Para se avaliar o efeito de concentrações supra-fisiológicas de LDL oxidada , LDL nativa humana foi isolada e oxidada de acordo com os protocolos previamente descritos (FREMONT; BELGUENDOUZ; DELPAL, 1999). Em resumo, sangue de indivíduo saudável (voluntário) não fumante foi coletado e centrifugado a 3.000 rpm por dez minutos. O plasma foi coletado e foram adicionados os conservantes. A densidade do plasma foi elevada para 1,21 com solução de Brometo de potássio (KBr), formando o gradiente descontínuo de densidade de duas camadas. Os tubos foram centrifugados por duas horas e meia a 50.000 rpm a 4ºC para separação das lipoproteínas de alta densidade. Após centrifugação, é retirada a fase superior e submetida à diálise por 24 horas. Para a oxidação da LDL, foi acrescido $CuCl_2$ a 1mM, para uma concentração final de 5μM. Após 3 horas e 30 minutos de oxidação a 37ºC, sob agitação constante e envolto em papel alumínio, a reação foi

finalizada com EDTA 0,5M (proporção de 2EDTA:1$CuCl_2$), dialisada e filtrada com filtro de seringa de 0,22 μm para esterilização.

3.2.3 Conjugação da LDL oxidada com Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

A conjugação da LDLox com o FITC foi realizada de acordo com protocolos previamente descritos (FREMONT; BELGUENDOUZ; DELPAL, 1999) , (RIOS et al., 2012). Em resumo, 1 mg/mL de LDL oxidada diluída em 0.1 M $NaHCO_3$ (pH 9.0) foi misturada com 10 μl/mL de FITC (estoque a 2 mg/mL em DMSO). A mistura foi homogeneizada a temperatura ambiente sob agitação por 3,5 horas. Após esse período o fluoroforo não marcado foi removido por diálise overnight em PBS. A LDL conjugada foi filtrada em filtro de 0,45 μm. A relação molar fluoróforo/proteína foi calculada a partir da intensidade de fluorescência a 530 nm (488 nm de excitação) e a absorbância a 492 nm e 280 nm. Assumindo o peso molecular relativo de 389 g/mol e 550000 g/mol para o FITC e a LDLox respectivamente.

3.2.4 Exposição de Macrófagos à LDL oxidada

As células isoladas dos animais C57/BL e $TLR4^{-/-}$, foram submetidas à concentrações supra-fisiológicas de LDL oxidada (50μg/mL) conjugada ou não com FITC.
Após isoladas, as células foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^5 células/poço ou tubo. Para experimentos de microscopia foram plaqueadas em placas de 6 poços e lamínulas estéreis foram colocadas no fundo dos poços. Após plaqueadas foram incubadas por 3 horas à 37° e o meio trocado para retirar células não aderidas. Para experimentos de citometria ou análise proteica , as células foram colocadas em tubo de polipropileno. As células foram expostas à LDL oxidada (50 μg/mL) por 1 hora. Os mesmos protocolos foram reproduzidos na presença de antagonista para os receptores CD36, PAFR e TLR, e inibidor seletivo da nNOS (TRIM, 100μM; INB1, 1μM ou NPA 100 nM).

3.2.5 Avaliação da captação da LDLox por fluorescência

Após estimulação das células com 50μg/mL de LDLox conjugada com fluoresceína-FITC por 1 hora, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% para análise da captação de LDLox por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.
Para análises microscópicas, as células foram lavadas com PBS, fixadas e o núcleo foi evidenciado pela montagem da preparação com o DAPI *mounting media* (Invitrogen, USA). As células foram fotografadas em microscópio de fluorescência (excitação 488nm; emissão 520 nm). capturando no minimo 4 campos por lâmina, e a intensidade de fluorescência foi analisada e corrigida por tamanho de cada célula. A mesuração foi realizada no software ImageJ(NIH, USA), utilizando a média de fluorescência corrigida pelo tamanho, circu-

lando as células pelo campo claro e subtraindo a intensidade de fluorescência do *background*.

A analise de captação ao longo prazo de LDLox em macrófagos, foi realizada usando LDLox não conjugada e após estimulo os macrófagos nas placas foram lavados com PBS e marcados com corante vermelho de nilo por 30 minutos (100 ng/mL) em PBS. o núcleo foi evidenciado pela montagem da preparação com o DAPI *mounting media* (Invitrogen, USA). As células foram fotografadas em microscópio de fluorescência (excitação 540nm; emissão 580/600 nm) e analisadas como citado acima.

Para as análise em citômetro de fluxo, células incubadas com LDLox não marcada foram analisadas para fixar os parâmetros de tamanho e granulosidade da população e o negativo para a fluorescência no canal FL-1. Após delimitação da população, macrófagos incubados com LDLox conjugada com FITC foram registrados no citômetro. A média da intensidade de fluorescência da população positiva no canal FL-1 junto coma porcentagem dentro dos macrófagos foi analisada no programa FlowJO (V10., LLC).

O papel da nNOS sobre a captação foi avaliado pela pre-Incubação por 30 min dos macrófagos com inibidores da nNOS (TRIM, 100μM; INB1, 1μM ou NPA 100 nM) e subprodutos dela: H2O2, (250μM) e doador de NO (SNAP, 300μM). A participação das outras isoformas foi avaliada pela pre-incubação com inibidor não seletivo da eNOS e iNOS (L-NIO, 10μM). 300 U/mL de SOD foram usados 30 minutos antes da exposição a LDLox para avaliação do efeito da biodisponibilidade de NO na captação.

Os macrófagos foram pre-incubados por 30 minutos com antagonistas dos receptores CD36 (SAB, 100μM), PAFR (PCA, 50 μM) e TLR2 ou TLR4 (AM, 1μM) e depois expostos a LDLox conjugada por 1h. foram utilizados anticorpos específicos (anti-TLR4, 1:50 e anti-TLR2, 1:50; SantaCruz, CA) durante 1 hora antes do estimulo com LDLox conjugada para confirmar a participação de cada receptor na captação. Alguns macrófagos pre-incubados com antagonistas foram co-incubados com os inibidores da nNOS (TRIM, 100μM; INB1, 1μM ou NPA 100 nM) para avaliar a participação de cada receptor e sua relação com a nNOS.

A participação das quinasses ERK1/2, JNK1/2, PI3K e PKA na captação foi avaliada pela pre-incubação dos macrófagos com os respectivos inibidores (PD98059, 10μM; JNKI, 10μM; LY294002, 10μM; H89, 10μM) por 30 minutos antes da exposição por 1 hora com LDLox conjugada com FITC.

Foi utilizado o inibidor de polimerização de filamentos de actina, Latrunculina A (LatA, 5μM) por 30 minutos antes da exposição á LDLox para avaliação do mecanismo de entrada de partículas de LDLox. células pre-incubadas com LatA foram co-incubadas com inibidor da nNOS (NPA, 100nM) e doador de NO (SNAP, 300μM) e após 30 min, incubadas com LDLox conjugada por 1 hora.

3.3 Cultura de células endoteliais humanas

Foi utilizada uma linhagem de células endoteliais humanas (as células híbridas EA.hy926, derivadas das células primárias HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells) comercialmente disponível (ATCC, USA). As células foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 100U/mL de penicilina e 100μg/mL de estreptomicina. Para realização dos experimentos, foram utilizadas placas para cultura celular de 6 e 12 poços. Quando necessário, lamínulas estéreis foram colocadas em cada poço. As células foram distribuídas na placa a uma densidade de 1×10^6 células/poço, em meio de cultura DMEM completo contendo soro fetal bovino e estreptomicina e penicilina. O soro fetal bovino do meio de cultura foi reduzido a 0,5% por pelo menos 24h de antecedência para se evitar que as células encontrem-se em processo de divisão na ocasião do experimento.

3.3.1 Estimulação de células endoteliais com Acetilcolina

As células foram plaqueadas numa densidade de 5×10^5 células/poço e o soro fetal bovino do meio de cultura foi reduzido a 0,5% 24h antes da exposição à Acetilcolina(Ach) (10 μg/mL) por 20 minutos para indução da atividade das NOS. Os mesmos protocolos foram reproduzidos na presença de inibidor da PKA(H89, 10 μg/mL), análogo do AMPc (8-Br-cAMP, 200 μg/mL) , inibidor não seletivo das fosfatases PP1 e PP2 (Calyculina A, 1 μg/mL) e o inibidor seletivo da fosfatase PP2 (Cyclosporina A, 10 μg/mL).

3.4 Imunolocalização de proteínas por microscopia de fluorescência

A expressão e localização subcelular da nNOS e PP1 e a sua associação (co-localização) com o TLR4 foi avaliada em microscopia de fluorecência e confocal pelo uso de anticorpos conjugados à fluorocromos Alexa Fluor 488, 564 e 647. Em resumo, as células foram plaqueadas e mantidas até a sub-confluência (60-70%) para o endotélio e a uma densidade de 5×10^5 células/poço para os macrófagos em lamínulas de vidro pré-tratadas com gelatina a 0,1% em PBS. As células foram estimuladas com LDLox por 1 h ou Ach por até 20 min, após pre-incubação ou nao com H89. Após os estímulos ou tratamentos, as células aderidas foram fixadas com paraformaldeído a 4%, lavadas (PBS + 0,3% de TritonX-100), seguido de bloqueio (5% de BSA, em PBS + 0,3% de TritonX-100) por 30 minutos, incubação com os anticorpos primários específicos (anti-nNOS, anti-PP1, anti-TLR4 e anti-Ve-caderina; (1:150) Santa Cruz Biotecnologia, USA) por 3.5 horas e anticorpos secundários conjugados às sondas fluorescentes Alexa Fluor 488, 564 ou 647 (Invitrogen, USA; 1:250) diluídos em tampão de bloqueio por 2.5 horas. O núcleo foi evidenciado pela montagem da preparação com o DAPI - *Prolong gold mouting media* (Invitrogen, USA). As células foram fotografadas em microscópio de fluorescência(NIKON-Eclipse) ou confocal (Zeiss 710) com excitação no

comprimento de 488 nm ou 647nm e a intensidade de fluorescência emitida foi analisada e corrigida por tamanho de cada célula ou região subcelular, definida pelo campo claro e a marcação do núcleo.

3.4.1 Analise de colocalização do TLR4 e nNOS

Para análise de colocalização, foi utilizada dupla marcação do receptor TLR4 e nNOS em células isoladas do peritôneo estimuladas ou não com LDLox e em cortes de artérias carótidas ocluídas de animais apoE-/- em O.C.T. A marcação e captura de imagens foi realizada como acima descrito. Para os cortes de carótida, a incubação do anticorpo primário foi feita *overnight*. O plugin COLOC2, uma modificação do JACOP do software FIJJI foi utilizado para avaliação do coeficiente de correlação de Manders (MCC). MCC é considerada uma melhor medida de colocalização devido a sua independência da proporção entre os dois sinais das duas marcações. Ainda tem a vantagem sobre o Coeficiente de correlação de Pearson(PCC) por prover as 2 frações: o MCC1: A fracão do sinal de A que co-ocorre com o sinal B e o MCC2: A fracão do sinal de B que co-ocorre com o sinal A. Foi considerada uma correlação forte quando valores de MCC estiveram acima de 0.8. O teste T-Student's foi utilizado para avaliar significância.

3.4.2 Analise de rearranjos e polimerização de actina

Após estimulo, as células foram fixadas por 10 min com PFA 4% e lavadas com PBS 3 vezes, incubadas com o conjugado de faloidina-488 (ex. 488 nm) por 30 minutos e o excesso de faloidina foi lavado com PBS. Foi adicionado meio de montagem com o DAPI - *Prolong gold mouting media* (Invitrogen, USA). As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse) (ex 495 nm em. 520). Foram capturadas imagens de 4 campos por lâmina e a análise do conteúdo de actina foi realizada pelo software ImgaeJ utilizando os valores de fluorescência bruta corrigidos pela área de cada célula.

3.5 Expressão e fosforilação proteica por Western-blot

O efeito dos tratamentos sobre a nNOS, algumas MAP quinases (como JNK e ERK1/2) e outras proteínas como a subunidade p67 do NAPDH foi analisado por Western Blot de lisados de células expostas a LDLox por 1 hora. A atividade da nNOS foi inferida pela análise dos níveis de fosforilação em nNOS-Ser1412 e nNOS-Ser852 de células incubadas com LDLox por 1 hora pre-incubadas ou não com AM (1 μM), H89 (10 μM), Calyculina A (Inibidor da PP1, 10 nM).

Após o período de incubação, as células foram lisadas em tampão de lise (NaCl 150 mmol/L; Tris 50 mmol/L; EDTA.2Na 5 mmol/L; MgCl2 1 mmol/L) acrescido de 0,3% de Triton X-100, 0,5% de SDS e de cocktail de inibidores de proteases (SigmaFast, Sigma), na

proporção de 1×10^6 células para 150μl de tampão de lise enriquecido com o cocktail de inibidores de proteases. O lisado celular foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos para separação da fração proteica. O extrato de proteínas foi aliquotado e congelado a $-80°C$ para posterior utilização. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951). As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X 0.25M tris HCl, pH=6.8, 3% Glycerol, 1%SDS, 0.6% b-mercaptoetanol, 0,25% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 100° C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 60μg de proteína em gel de SDS-PAGE (sodium dodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida) a 7,5 ou 10% utilizando-se o sistema Mini-Protean tetra cell (Biorad). Após serem separadas no gel de poliacrilamida (100V; 90 minutos), as proteínas foram transferidas (100V; 100 minutos) para uma membrana de nitrocelulose com poro de 0,45μm (Millipore, USA). 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 (3%de albumina e 0,1% de Tween-20, em TBS).
Após o bloqueio, a membrana foi incubada overnight a 4° C com o anticorpo primário específico, diluído em solução de bloqueio. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-NOS1 (nNOS) (1:1000; monoclonal feito em coelho; Santa Cruz), anti-phospho-NOS1-Ser852 (p-nNOS Ser852) (1:1000; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz), anti-NADPH-p67 (1:1000; monoclonal feito em camundongos; Sigma-Aldrich) e anti-GAPDH (1:1000; monoclonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3%de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) (1:5000, IgG-HRP; Sigma,St.Louis, MO) diluído em 1% de albumina em TBS-Tween. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência (kit ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitomérica através do software ImageJ.

3.6 Avaliação de Interação proteica por Co-imunoprecipitacão

A interação do receptor TLR4 e outros receptores, a sua interação com as proteínas alvo como nNOS, assim como, a interação da PP1 e NIPP1 foi avaliada por experimentos de precipitação usando beads magnéticas de protA/G (ABCAM) junto com anticorpos específicos para o TLR4, nNOS e NIPP1 e detectando as outras proteínas do complexo por Western Blot.

Após o período de incubação, as células foram lisadas em tampão de lise sem DTT e SDS. O tampão foi acrescido e de cocktail de inibidores e de proteases (SigmaFast, Sigma). O lisado celular foi centrifugado a 14000 rpm por 20 minutos para separação da fração proteica. O extrato de proteínas foi quantificado e 200 μg de proteína foram misturados

com 5 μL de anticorpo anti-TLR4, anti-nNOS ou anti-NIPP1 por 2 horas sob agitação. As beads magnéticas de protA/G foram lavadas, por centrifugação com PBS e 15 μL das beads foram adicionadas ao complexo de proteína da amostra com anticorpo. A mistura se manteve sobe agitação overnight na geladeira. Após incubação foi adicionado 100 μL de TRIS 5 μM as amostras e misturadas por inversão. as amostras foram colocadas em suporte magnético e o sobrenadante descartado. As beads foram lavadas com tampão de eluição para desligar do complexo de proteínas e anticorpo e colocadas no suporte magnético. foram adicionados 10 μL de tampão de neutralização e o sobrenadante foi retirado e aliquotado para ser separado em gel de poliacrilamida , transferido a membrana de nitrocelulose e incubado com os anticorpos anti-nNOS, anti-TLR4, anti-NIPP1, anti-PP1 e anti-CD36, como realizado para detectar as proteínas pelo método do western blot mencionado no item anterior.

3.7 Medidas da produção de NO, Superoxido e mobilização de Ca2+ por citometria de fluxo

Foram utilizadas sondas intracelulares fluorescentes para a detecção das referidas espécies nos macrófagos sob os diferentes estímulos: o DAF-FM(4-Amino-5-methylamino-$2', 7'$-difluorofluorescein, Invitrogen, USA) para o NO, e o DHE (DiHidro Etidium) para Superóxido . As células foram plaqueadas a uma densidade de 5×10^5/poço, as células foram carregadas 30 minutos antes do estimulo, com 2,5 μM de sonda em meio RMP-I sem vermelho de fenol e incubadas a 37°C. Apos marcação as células foram incubadas com inibidor da nNOS (NPA, 100 nM) ou antagonista TLR2/4 (AM, 1 μM) por 30 minutos e depois estimuladas por 1 hora com LDLox. Para analise de produção de NO sem a inativação pelo superóxido, macrófagos marcados com DAF, foram tratados com SOD (300U/mL) por 30 minutos e depois incubadas ou não com AM(1 μM) e NPA (100 nM) por mais 30 minutos, antes da exposição com LDLox por 1 hora. Após incubação, as células foram centrifugadas e fixadas com 100 μL de paraformaldeído a 4% em PBS (pH=7.4) e 100 μL de PBS.

Análise da mobilização de cálcio foi avaliado pela fluorescência de células ou retículos marcados com FLUO-4 (1μM) por 45 minutos e FLUO-5N (1μM) por 2 horas, respectivamente. Após marcação, as células foram lavadas com meio sem soro e estimuladas no momento da leitura. Primeiro foram tratadas com antagonista do receptor TLR2/4 (AM, 1uM) inibidores da quinase PKA (H89, 10μM) e inibidor não seletivo da PLC (PMSF, 1μM). Depois dos tratamentos as células foram estimuladas por diferentes tempos com LDLox (50 μg/mL) .

A leitura de 15000 células por experimento foi realizada no citômetro FACScan e

FACScalibur (BD Biosciences) e os resultados foram analisados pelo sofware FlowJO. A média de fluorescência positiva para o canal FL-1 foi multiplicada pela porcentagem de células marcadas da população total de macrófagos (definida pela delimitação de tamanho e granulosidade) e o resultado foi expresso como fluorescência média± EPM.

3.8 Reatividade vascular para análise da função endotelial

A montagem da aorta foi feita conforme descrito anteriormente (Capettini et al., 2008; Capettini et al., 2011). Os animais foram sacrificados por decapitação, a aorta torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecido adiposo e conjuntivo. A artéria foi dividida em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Para obtenção do registro de tensão isométrica, os anéis foram montados em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseileit (em mmol/L: NaCl, 118,3; KCl, 4,7; MgSO4, 1,2; KH2PO4, 1,2; CaCl2, 2,5; NaHCO3, 25; glicose,11,1), aerada continuamente com mistura carbogênica (95% de O2 + 5% de CO2), mantida à temperatura de 37° e pH=7,4. Duas hastes metálicas triangulares foram colocadas através do lúmen dos vasos. Um dos triângulos foi fixado na base, e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutridora foi trocada a cada 15 minutos, Os registros experimentais foram feitos com o uso de transdutores de tensão isométrica, conectados a um amplificador, sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital utilizando-se o programa Windaq para aquisição e análise dos dados experimentais.

Curvas concentração-resposta cumulativas foram construídas em resposta a acetilcolina, em vasos pré-contraídos com fenilefrina, contendo endotélio funcional . A participação e ativação da nNOS endotelial na função endotelial foi avaliada nos animais controle e silenciados para eNOS sob diferentes tratamentos em experimentos realizados na presença de (Calyculina A e Cyclosporina A; 10μM), em preparações contendo endotélio funcional.

3.8.1 Silenciamento agudo da eNOS em camundongos pelo uso de Oligodeoxynucleotidos anti-sence (AS-ODN)

Foram utilizadas as sequências: 5'-CTC TTC AAG TTG CCC ATG T-3' para eNOS e para o controle uma sequência mismatch ODN (MM-ODN): 5'-GTC TTG AAC TTC CCG ATC T-3'. (Eurogentech North America Inc, USA). As sequências AS-ODN ou MM-ODN foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%) estéril para uma concentração de 1nmol/100μL. Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (100 mg/mL) e xilazina (20 mg/mL) 1:4 (v:v) e foram administrados 2 nmoles do AS-ODN ou MM-ODN por via

intra-venosa, através da veia peniana. Após 48 h, curvas concentração-resposta cumulativas para a acetilcolina, foram realizadas e comparadas com curvas controles.

3.9 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em diagrama de caixa representando a mediana e distribuição ou como média±EPM para dados de cinética. Teste de Grubbs foi usado para identificação de outliers. Os resultados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) de duas vias quando paramétricos (avaliados pelo teste de normalidade D'agostino-Pearson), usando como *p*ost hoc o teste Tukey, ou o teste bomferroni para medidas continuas no tempo. Quando os dados foram não paramétricos as comparações foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis , usando como *p*ost hoc o teste de Dunn's. Demais resultados comparando somente 2 grupos foram analisados através do teste t-student não pareado de dois colas para dados paramétricos e pelo teste Mann-withney de dois colas para dados não paramétricos. Os resultados foram considerados significativos quando $P<0,05$.

4 Resultados

4.1 Regulação da captação de LDLox pela nNOS

A disfunção endotelial precede a formação de células espumosas e progressão da placa aterosclerótica. Dados ainda em fase de publicação forneceram os primeiros indícios de que a nNOS participa da regulação da captação de LDLox em células endoteliais reduzindo a inflamação endotelial em resposta à LDLox. Ao avaliar a resposta de captação de LDLox por macrófagos, que tem a função de reconhecer e fagocitar estas e outras moléculas, encontramos que a inibição da nNOS com o TRIM (100 μmol/L) aumenta a captação de LDLox após 6 horas e a reduz depois de 24 horas (Figuras 1A e 1B, respectivamente). sugerindo então um papel modulatório que varia com o tempo de exposição. O tratamento com o TRIM (100 μmol/L) não induz citotoxicidade em macrófagos após 1, 6 e 24 horas, por ensaios com MTT (dados não mostrados).

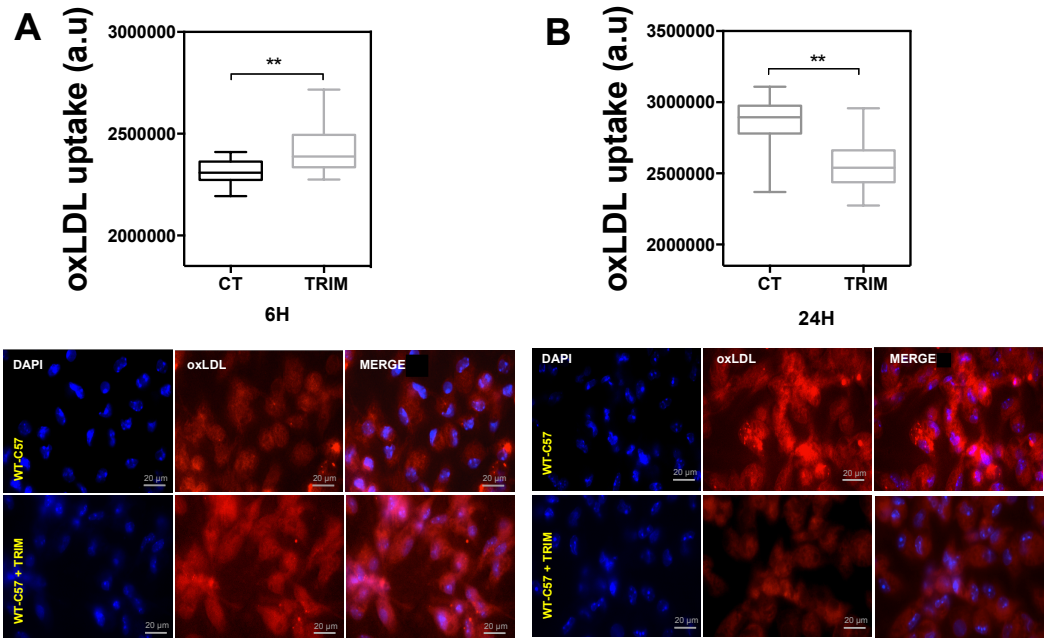


Figura 1 – Modulação da captação de LDLox pela nNOS em macrófagos

Papel da nNOS na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 6 (A) ou 24 h (B) de estímulo. Macrófagos peritoniais foram incubados com LDLox na ausência e na presença de TRIM (100 μmol/L). Fluorescência do vermelho de nilo apos marcação de lipídeos, foi analisada no canal do TRITC, corrigida pelo tamanho de cada célula, de pelo menos 5 campos fotografados de cada experimento. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $**p<0,01$.

4.1.1 Papel da nNOS sobre a captação rápida de LDLox por macrófagos

Baseados nos dados acima, resolvemos investigar o efeito regulatório da nNOS nos eventos iniciais relacionados à captação de LDLox por macrófagos, simulando uma fase aguda no processo aterosclerótico e com o proposito de isolar possíveis respostas de regulação transcricional. Para isso, os macrófagos foram incubados por 1h com LDLox conjugada com FITC na presença de dois inibidores seletivos da nNOS: o TRIM (100 μmol/L) e o NPA (100 nmol/L). Ambos os inibidores aumentaram a captação de LDLox (Figura 2). Para se descartar o possível papel das outras duas isoformas da NOS (eNOS e iNOS), foi utilizado o L-NIO (10 μmol/L), um inibidor não-seletivo da eNOS e iNOS , que não alterou a captação de LDLox (Figura 2).

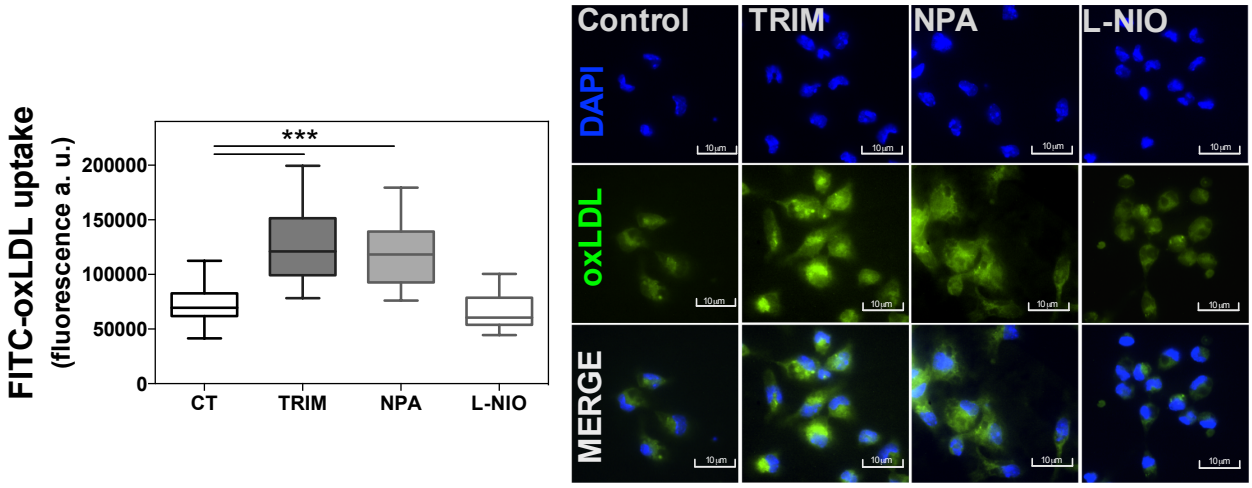


Figura 2 – Participação da nNOS na captação rápida de LDLox em macrófagos

Papel da nNOS na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 hora de estímulo. Os macrófagos foram incubados com FITC-LDLox por 1 hora na ausência e na presença de TRIM (100 μmol/L), NPA(100 nmol/L) e L-NIO (10 μmol/L), pre-incubados por 30 minutos. Foi analisada a Fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula de pelo menos 5 campos fotografados de cada experimento. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0{,}001$.

4.1.2 Efeito dos produtos da nNOS sobre a captação rápida de LDLox em macrófagos

As duas principais moléculas produzidas pela nNOS em condições fisiológicas são o NO e o H_2O_2. Assim, resolvemos investigar se essas duas espécies estavam envolvidas na redução da captação de LDLox. Para tal, os macrófagos foram incubados com um doador de NO (SNAP, 300 μmol/L) ou com H_2O_2 exógeno (500 μmol/L), previamente à incubação com a LDLox conjugada com FITC. A incubação com o SNAP inibiu a captação de LDLox

e a incubação com H_2O_2 não alterou a captação de LDLox pelos macrófagos, sugerindo um papel mais importante do NO na inibição da captação de LDLox (Figura 3).

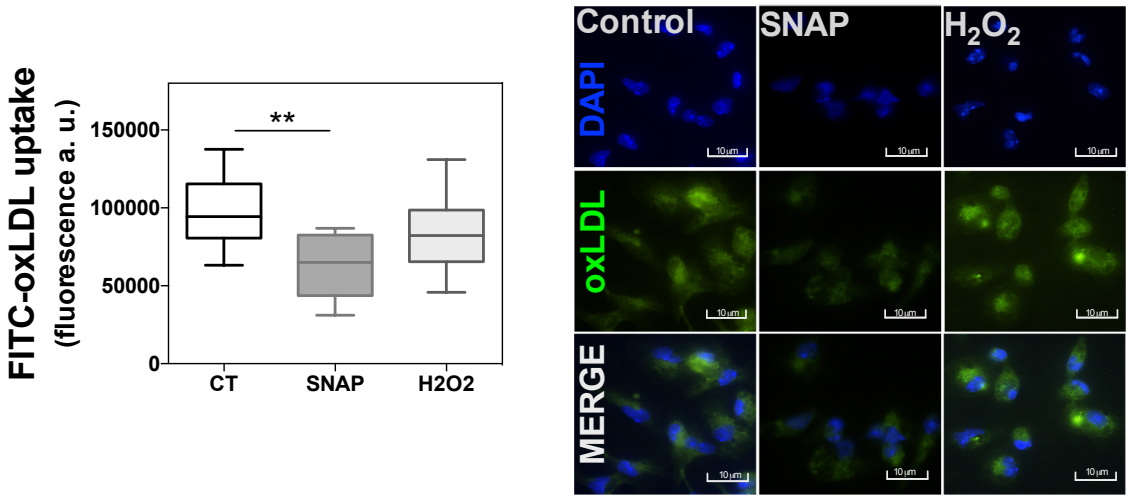


Figura 3 – Participação dos produtos da nNOS na captação rápida de LDLox em macrófagos

Efeito do NO e do H_2O_2 na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 h de estímulo. Os macrófagos foram incubados com FITC-LDLox por 1 hora na ausência e na presença do doador de NO (SNAP, 300 μmol/L) ou H_2O_2 exógeno (250 μmol/L). Foi analisada a Fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0{,}001$.

Para avaliar o efeito concentração dependente dos produtos da nNOS sobre a captação rápida de LDLox, os macrófagos foram expostos a varias concentrações de SNAP e H_2O_2 . Observou-se que o efeito do doador de NO começa a partir de concentração de 200 μmol/L (figura 4), enquanto não se observou diminuição da captação para o H_2O_2 em nenhuma concentração. Evidenciou-se, de forma contraria, um aumento na captação quando as concentrações de H_2O_2 sobem acima de 500 μmol/L(figura 5). Esses dados confirmam a participação do NO e não do H_2O_2 na regulação da captação pela nNOS.

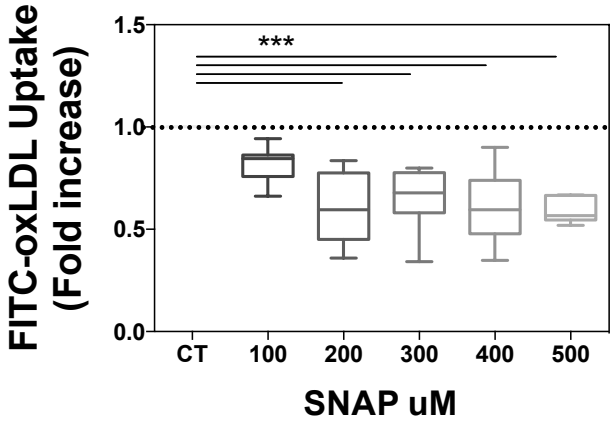


Figura 4 – Modulação da captação rápida de LDLox pelo NO em macrófagos

Efeito do NO na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 h de estímulo. Os macrófagos foram incubados com FITC-LDLox na presença de varias concentrações do doador de NO (SNAP, em μmol/L). Foi analisada a Fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0{,}001$.

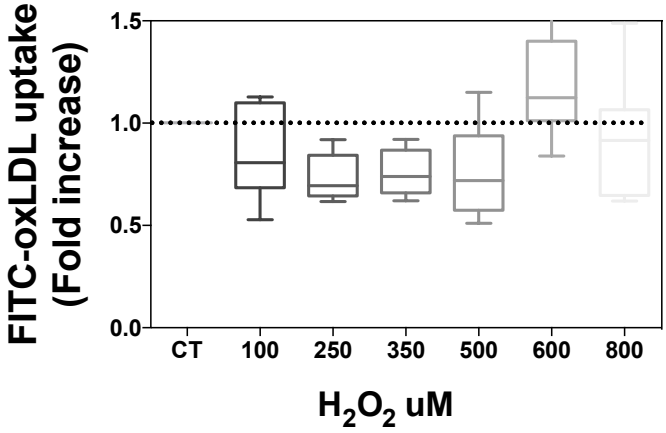


Figura 5 – Modulação da captação rápida de LDLox pelo H_2O_2 em macrófagos

Efeito do H_2O_2 na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 h. Os macrófagos foram incubados com FITC-LDLox na presença de varias concentrações de H_2O_2 (emμmol/L). Foi analisada a Fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0{,}001$.

4.1.3 Biodisponibilidade de NO durante a exposição rápida à LDLox em macrófagos

Baseados nos efeitos do NO na inibição da captação de LDLox, resolvemos avaliar a biodisponibilidade do mesmo pelos macrófagos estimulados com LDLox. A biodisponibilidade de NO foi avaliada em tempos diferentes por até 1h. Evidenciou-se uma redução na biodisponibilidade do NO com 1h (Figura 6). Estes dados nos levaram a questionar se durante o estímulo, os macrófagos também estariam produzindo radicais superóxido, os quais reduzem a biodisponibilidade de NO. Durante 1h de estímulo, observou-se relativo aumento de superoxido, o que poderia explicar, pelo menos em parte, a redução de NO com 1h (Figura 6).

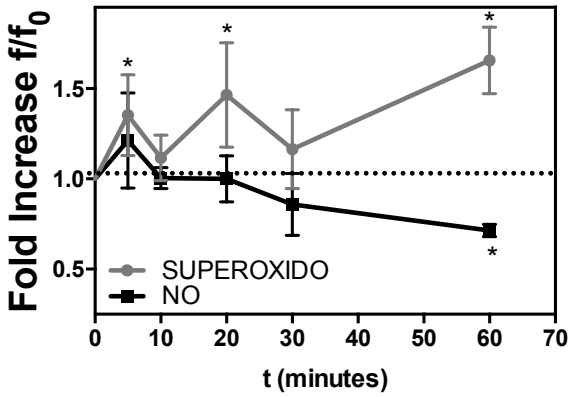


Figura 6 – Biodisponibilidade de NO durante a exposição rápida à LDLox em macrófagos

Cinética da produção do NO e superóxido durante a captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 h. Os macrófagos foram carregados com as sondas DAF-FM (5 μM), para medir NO e DHE (2,5 μM) para medir superóxido por 30 minutos, e depois incubados com LDLox. Foi analisada a Fluorescência média no canal do FL1 para NO e FL2 para Superóxido. Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 6 experimentos independentes. Foram analisados 15.000 eventos de fluorescência a cada experimento. $*p<0{,}05$.

4.1.3.1 Possíveis fontes de superóxido durante o processo de captação

Dados na literatura sugerem que o desacoplamento da nNOS pode levar a produção excessiva de radicais superóxido. Contudo, trabalhos sugerem que a enzima NADPH oxidase é ativada durante a exposição à LDLox. Avaliamos a expressão da subunidade p67 da NADPH oxidase e observou-se um aumento de sua expressão após 30 min, o qual perdura por 1h (Figura 7). Este resultado confirma a ativação da NADPH oxidase em resposta a LDLox.

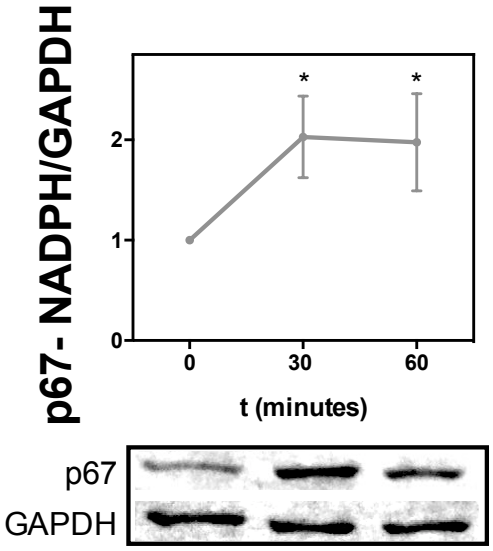


Figura 7 – Expressão proteica da NADPH - subunidade p67 em resposta à LDLox em macrófagos

Avaliação da expressão da subunidade p67 da NADPH oxidase por Western blot em macrófagos estimulados com LDLox (50 μg/ml) por 1 hora. Analise densitométrica foi realizada das bandas detectadas com anti-P67. Resultados foram normalizados pelo conteúdo de GAPDH em cada amostra e expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos separados. $*p<0{,}05$.

Com o fim de avaliar a produção de NO sem a inativação pelos radicais superóxido, os macrófagos foram incubados com 300 U/mL de SOD por 30 min e depois estimulados com LDLox. Durante a hora de incubação com LDLox observou-se um aumento na produção de NO que foi inibido pela pré-incubação com o inibidor seletivo da nNOS, NPA (100nmol/L). Esse resultado sugere que há uma ativação da nNOS durante a exposição à LDLox (figura 8).

4.1.3.2 Efeito da conversão do superóxido na captação de LDLox em macrófagos

Uma vez que o NO inibe a captação de LDLox e o estímulo com a mesma aumenta a produção de superóxido pelos macrófagos, resolvemos avaliar se o *scavenging* de radicais superóxido com a SOD influenciaria na captação. O tratamento com a SOD reduziu a captação (Figura 9), sugerindo mais uma vez que o superoxido produzido durante o processo reduz a biodisponibilidade de NO e consequentemente previne a modulação da captação de LDLox.

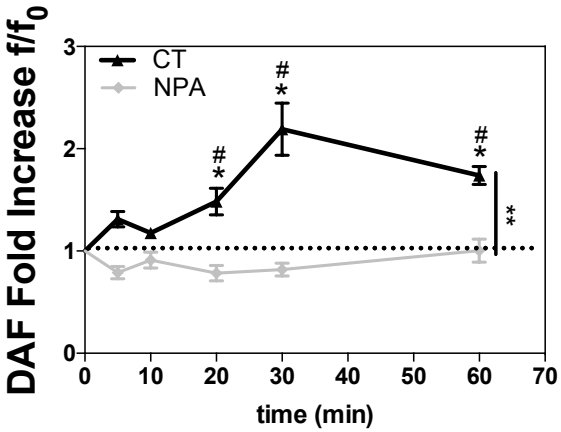


Figura 8 – Produção de NO em resposta à LDLox na presença de SOD em macrófagos

Cinética da produção do NO durante exposição à LDLox (50 μg/ml) durante 1 h. Os macrófagos foram carregados com a sonda DAF (5μM) e pré-incubados com SOD (300 U/mL) por 30 minutos e parte destes macrófagos foi co-incubada com NPA (100 nmol/L) 30 minutos antes do estímulo com LDLox. Após estímulo por 1 hora, foi analisada a fluorescência média no canal do FL1 para NO e os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 6 experimentos independentes. Foram analisados 15.000 eventos de fluorescência a cada experimento. $*p<0{,}05$.

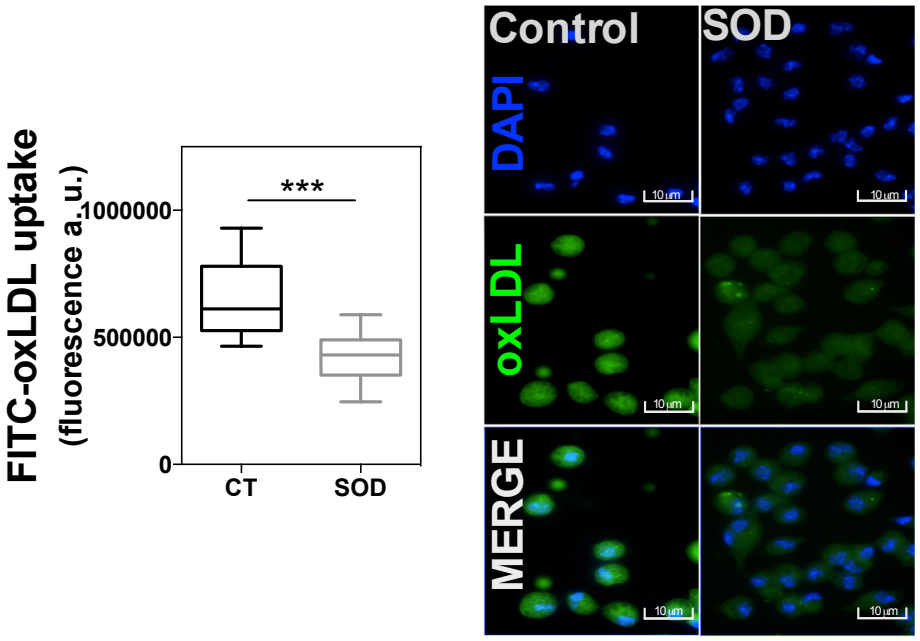


Figura 9 – Modulação da captação rápida de LDLox pela SOD em macrófagos

Efeito do tratamento com a enzima superóxido dismutase (SOD, 300 U/mL) na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 h. Foi analisada a Fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0{,}001$.

4.1.4 Ativação da nNOS em macrófagos

Um vez demonstrada a participação da nNOS e a alteração da biodisponibilidade de NO durante o estímulo com LDLox, avaliamos a ativação da nNOS através dos níveis de fosforilação dos resíduos de Ser852 (sítio de inativação) e Ser1417 (sítio de ativação). Os resultados mostram que após 1h de estímulo, há redução dos níveis de fosforilação no resíduo Ser852 e leve aumento de fosforilação no resíduo Ser1412, sugerindo ativação da mesma (Figura 10).

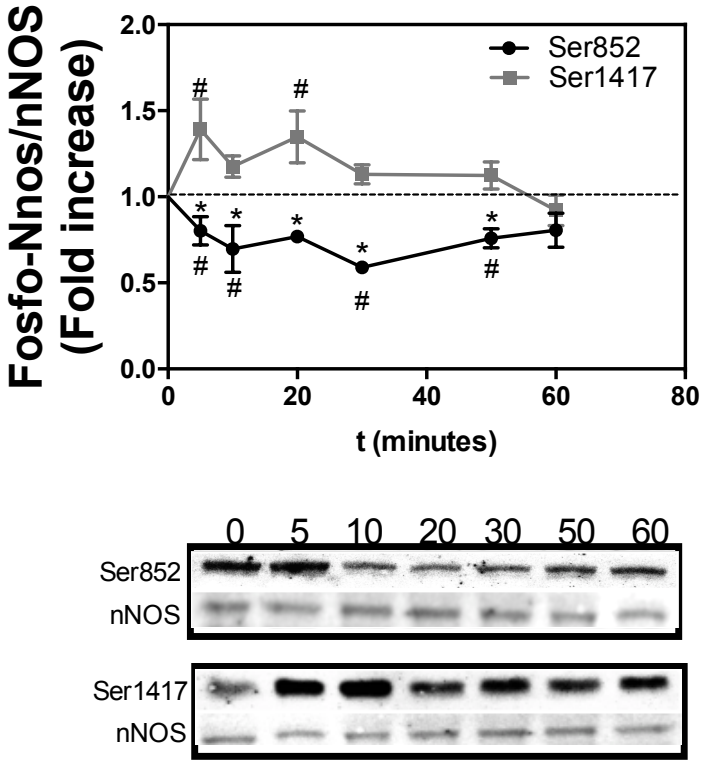


Figura 10 – Atividade da nNOS durante a captação de LDLox em macrófagos

Avaliação dos níveis de fosforilação da nNOS nos resíduos ser852 e ser1417 da nNOS, por Western blot. Os resultados dos níveis de fosforilação analisados por densitometria apos detecção do anti-fosfo-nNOS foram normalizados pela nNOS total detectada em diferentes tempos durante 1 hora de estimulo com LDLox(50 μg/mL) e expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. $*p<0{,}05$.

4.2 Modulação dos receptores *scavenger* pela nNOS

Dentre os vários receptores *scavenger* para lipídeos oxidados em macrófagos, destacam-se o CD36, receptor PAF (PAFR) e receptores toll-like 2 e 4 (TLR2/4). Os 3 reconhecem a LDLox embora não está descrita nenhuma relação deles com a nNOS.

4.2.1 Modulação dos receptores *scavenger* pela nNOS na captação rápida de LDLox

Receptor CD36

A modulação do CD36 pela nNOS foi avaliada utilizando-se o antagonista dos receptores CD36, Ácido Salvianólico B (SAB) (100 μmol/L) e os inibidores da nNOS, TRIM (100 μmol/L) e INB1 (1 μmol/L). O antagonismo agudo dos receptores CD36 com o SAB aumentou a captação de LDLox (Figura 11A). Contudo, este aumento na captação não foi alterado pela inibição da nNOS tanto com o TRIM (Figura 11A) quanto com o INB1 (Figura 11B). Estes dados sugerem que, pelo menos na primeira hora de estímulo, os receptores CD36 não são os receptores mais importantes no processo de captação, embora os dados com os inibidores da nNOS simultaneamente ao SAB nos sugerem que a nNOS poderia estar comprometida quando o CD36 é antagonizado.

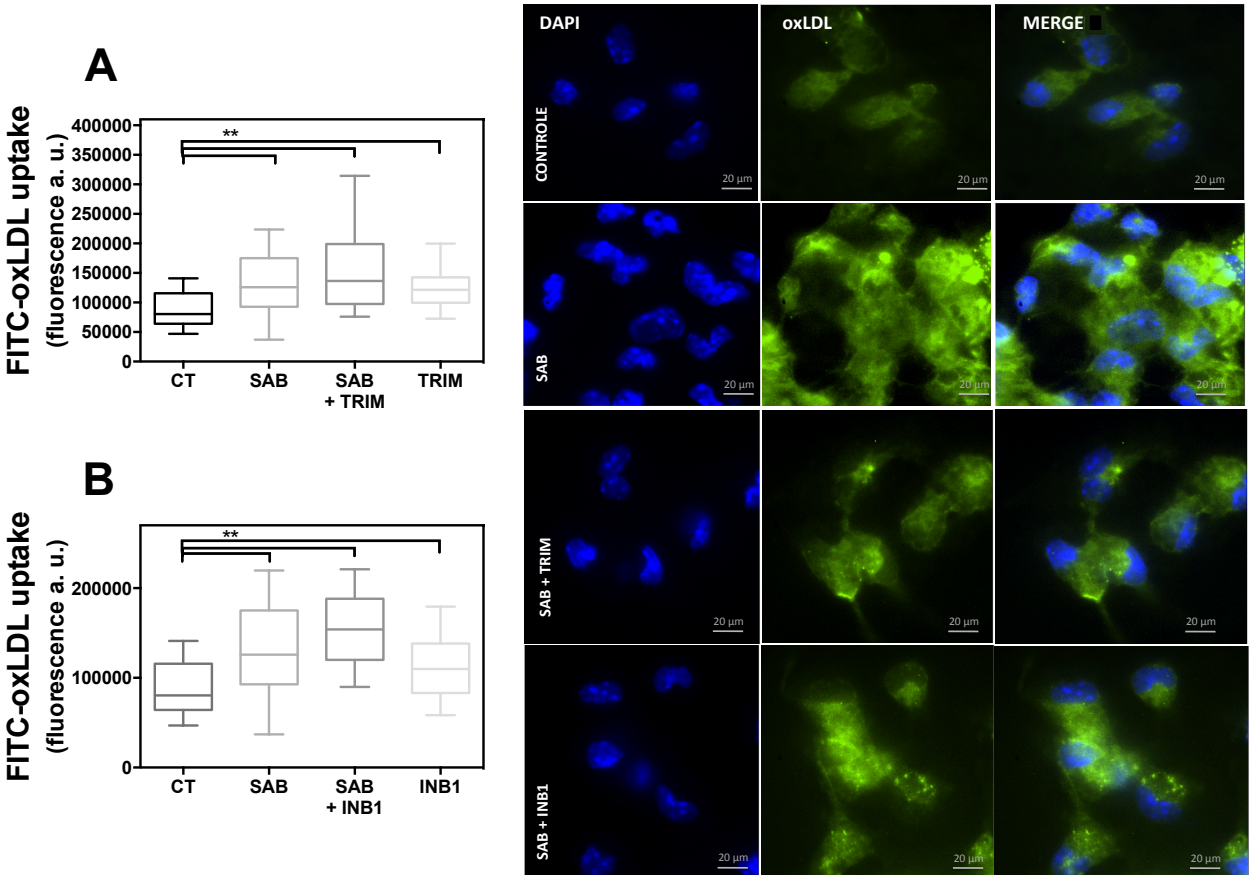


Figura 11 – Participação dos receptores CD36 na captação rápida de LDLox em macrófagos

Captação de FITC-LDLox por 1 hora em macrófagos na presença do SAB (10 μM) antagonista CD36, pré-incubado por 30 minutos. A. resultados obtidos na presença ou não do TRIM (100 μM). B. resultados obtidos na presença ou não do INB1 (1μM). Foi analisada a Fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $*p<0,05$, $**p<0,01$.

Receptor PAF

A modulação do PAFR pela nNOS foi avaliada utilizando-se o antagonista dos receptores PAF em macrófagos de camundongos controle, PCA-4248 (50 μmol/L) e os inibidores da nNOS, TRIM (100 μmol/L) e INB1 (1 μmol/L). O antagonismo agudo dos receptores PAF com o PCA reduziu de forma discreta a captação de LDLox (Figura 12). Este resultado foi prevenido pela inibição da nNOS tanto com o TRIM (Figura 12A) quanto com o INB1 (Figura 12B). Estes dados sugerem que, pelo menos em parte, os receptores PAF contribuem para a captação da LDLox na primeira hora, mas não são os receptores mais importantes no processo de captação. Ainda, os dados com os inibidores da nNOS simultaneamente ao PCA nos sugerem que a nNOS controla a captação de maneira independente do PAFR.

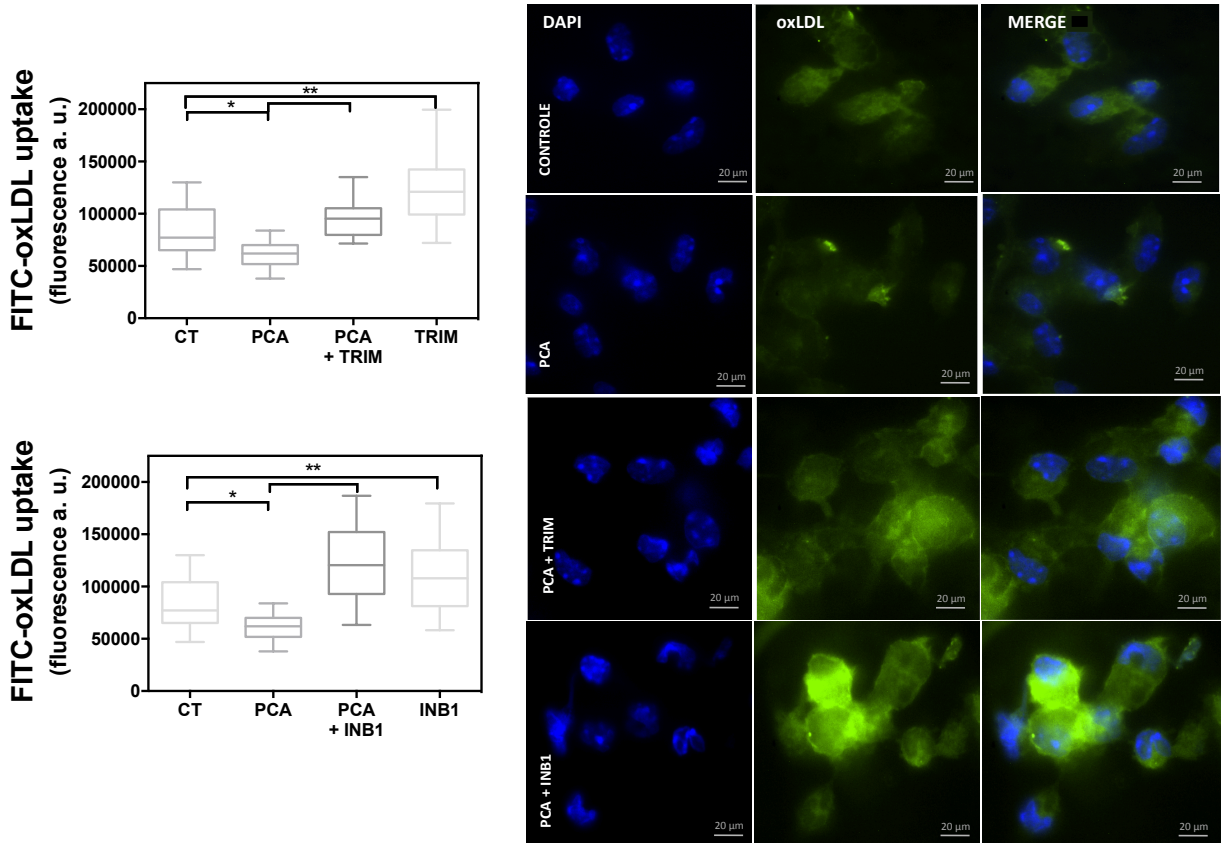


Figura 12 – Participação dos receptores PAF na captação rápida de LDLox em macrófagos

Captação de LDLox em macrófagos por 1 hora na presença do antagonista PAFR (PCA 50 μ/mol), pré-incubado por 30 minutos. A. resultados obtidos na presença ou não do TRIM (100 μM). B. resultados obtidos na presença ou não do INB1 (1μM). Foi analisada a fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***$p<0,001; $**$p<0,01; $*$p<0,05.

4.2.2 Participação do TLR4 na captação rápida da LDLox

A modulação dos receptores TLR2 e TLR4 pela nNOS foi avaliada utilizando-se o antagonista dos receptores TLR4 e TLR2, a amitriptilina (AM)(10 μmol/L) em macrófagos de camundongos controle (C57BL/6J), e macrófagos isolados de animais $TLR2,4^{-/-}$, pré-incubados ou não com os inibidores da nNOS, TRIM (100 μmol/L) e INB1 (1 μmol/L). O antagonismo agudo dos receptores TLR4 e TLR2 com amitriptilina reduziu a captação de LDLox (Figura 13B). Este resultado não foi alterado pela inibição da nNOS com o TRIM (Figura 13B). Estes dados sugerem que os receptores TLR4 e TLR2 contribuem de forma importante para a captação da LDLox na primeira hora e que são modulados pela nNOS visto que o antagonismo do receptor abole o efeito do TRIM (Figura 13). Ao se comparar o efeito dos inibidores da nNOS na captação da LDLox em macrófagos de camundongos $TLR2,4^{-/-}$ podemos confirmar os dados supracitados. A inibição da nNOS

aumenta a captação em camundongos controle mas não altera a captação em camundongos $TLR2,4^{-/-}$ (Figura 13A). Estes resultados indicam que há uma relação entre o TLR4 e/ou TLR2 e a nNOS.

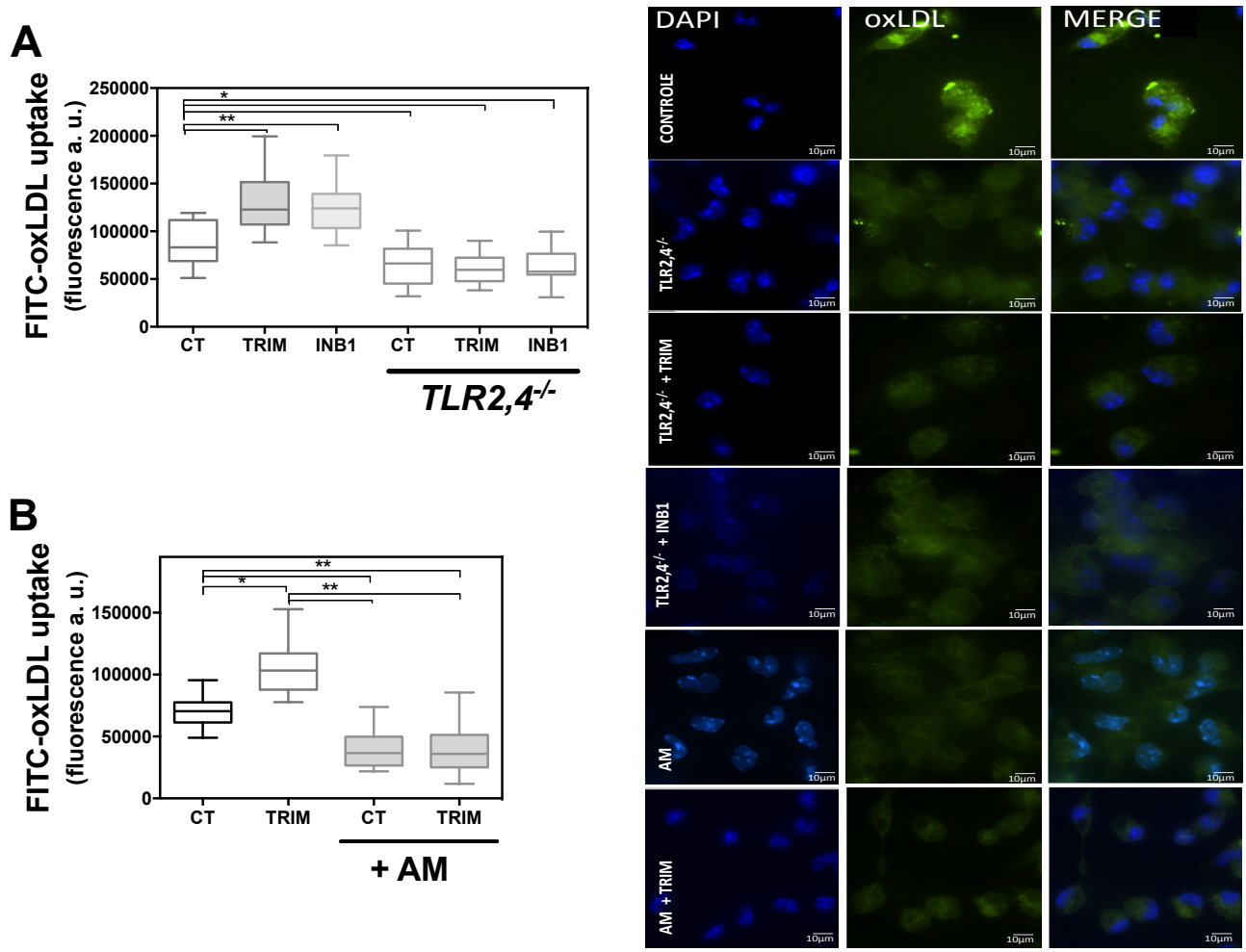


Figura 13 – Modulação da captação de LDLox pela nNOS via TLR4 e TLR2

Captação de LDLox por 1 hora em , A. macrófagos de animais silvestres (C57/BL6) e $TLR2/4^{-/-}$. B. resultados comparativos de camundongos controle sem e com tratamento com AM (1μM). efeito da pré-incubação com TRIM (100μM) e INB1 (1μM). Foi analisada a fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***$p<0,001; $**$p<0,01; $*$p<0,05.

Para verificar a relação da nNOS com o TLR4 , foram usados camundongos $TLR4^{-/-}$ e um outro inibidor seletivo da nNOS, o NPA (100 nmol/L) e observou-se abolição do efeito na captação quando a nNOS é inibida em macrófagos de animais $TLR4^{-/-}$ e tratados com AM (figura 14).

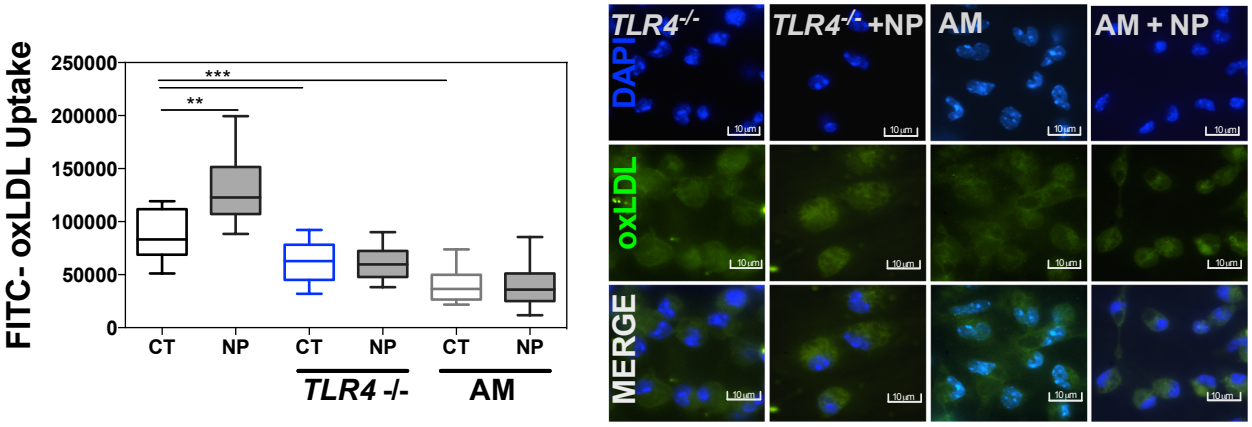


Figura 14 – Modulação da captação de LDLox pela nNOS via TLR4 em macrófagos

Resultados obtidos em macrófagos de camundongos controle comparativos de camundongos $TLR4^{-/-}$ e tratados com AM (1 μM). efeito da pré-incubação com NPA (100 nM) por 30 minutos antes de exposição com LDLox (50 μg/mL) por 1 hora. Foi analisada a fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0,001$; $**p<0,01$; $*p<0,05$.

Para avaliar o papel dos mediadores produzidos pela nNOS, o NO e H_2O_2, sobre os receptores TLR4 de forma aguda, foram utilizados o doador de NO (SNAP) e o H_2O_2 exógeno na presença do antagonista do TLR4, amitriptilina (1 μmol/L). Como demonstrado anteriormente, o NO mas não o H_2O_2 reduz a captação de LDLox. Contudo, em presença da amitriptilina, este efeito é abolido, sugerindo mais uma vez que a inibição da captação de LDLox na primeira hora ocorre por inibição da via do TLR4 (Figura 15).

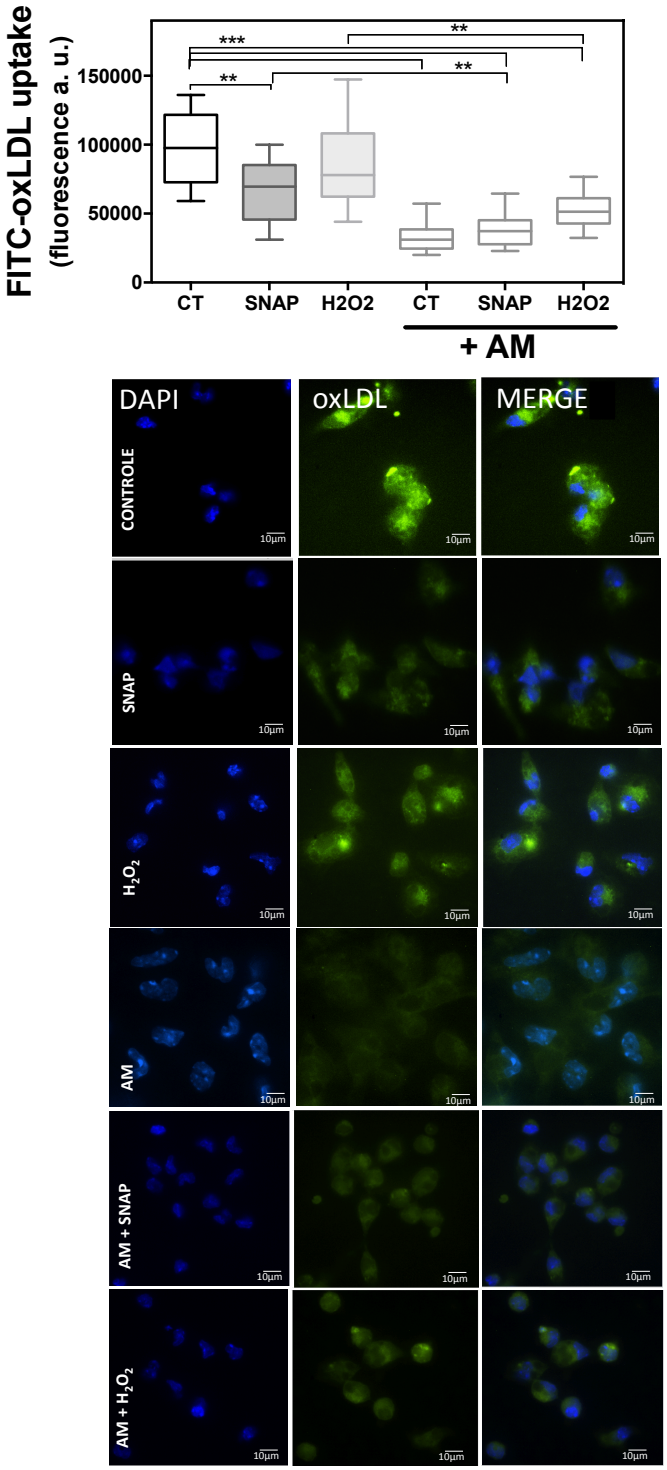


Figura 15 – Modulação da captação de LDLox pelos produtos da nNOS via TLR4

Efeito do NO e do H_2O_2 na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 h de estímulo na presença da amitriptilina (1 μ/mol), antagonista TLR4. Os macrófagos foram incubados com LDLox na ausência e na presença do doador de NO (SNAP, 300 μmol/L) ou H_2O_2 exógeno (250 μmol/L). Foi analisada a fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $**p<0{,}001$.

Para confirmar a participação do TLR4 na captação rápida e a eficiência do uso de AM como antagonista do TLR4, a captação de LDLox foi avaliada durante 1 hora de incubação com a LDLox em macrófagos $TLR4^{-/-}$ e pre-incubados com anticorpos anti-TLR4 para comparar com os tratados com AM. A captação aumentou ao longo do tempo e foi inibida pela pre-incubação com AM e nas células dos animais $TLR4^{-/-}$ (Figura 17). Após 1 hora, os macrófagos incubados com AM apresentaram uma redução da captação, no mesmo nível das células $TLR4^{-/-}$ e dos macrófagos bloqueados com anticorpo anti-TLR4 (figura 16). Estes resultados confirmam a participação do TLR4 na captação rápida de LDLox em macrófagos.

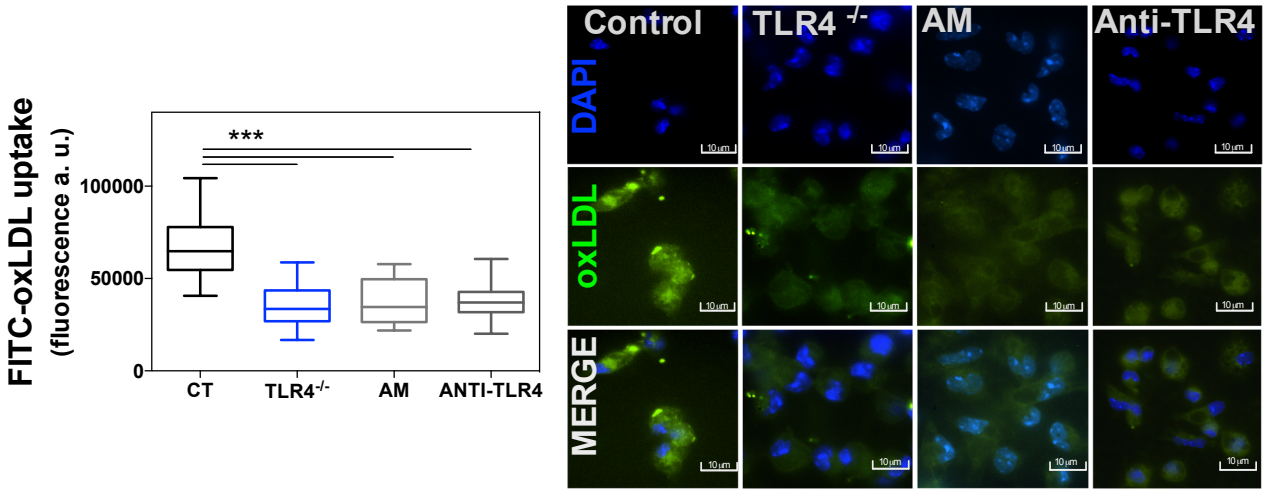


Figura 16 – Participação do TLR4 na captação rápida de LDLox em macrófagos

Participação dos receptores TLR4 na captação aguda de LDLox em macrófagos. resultados obtidos em macrófagos de camundongos controle pré-incubados com AM (1 μM) e com anticorpo anti-TRL4 por 1 horas e de $TLR4^{-/-}$ expostos a 1 h de LDLox conjugada com FITC. Foi analisada a fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***$p<0,001; $**$p<0,01; $*$p<0,05.

Para se excluir a participação dos receptores TLR2 na resposta obtida com os macrófagos dos animais incubados com AM, bloqueamos de forma seletiva o receptor TLR2 em macrófagos de camundongos controle através do uso de anticorpos anti-TLR2 e macrófagos de animais $TLR2^{-/-}$ (Figura 18). Nem o bloqueio dos receptores TLR2, nem a deleção do TLR2 alterou a captação de LDLox (Figura 18). Estes dados excluem a participação dos TLR2 no processo inicial de captação de LDLox.

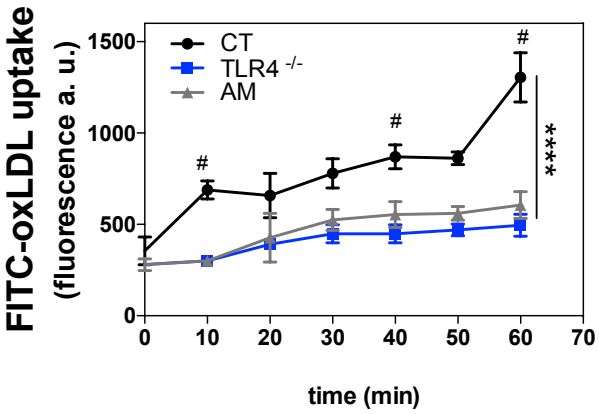


Figura 17 – Participação do TLR4 na captação rápida de LDLox ao longo de 1 hora

Participação dos receptores TLR4 na captação aguda de LDLox em macrófagos. Resultados obtidos em macrófagos de camundongos controle pré-tratados com AM (1 μM) e $TLR4^{-/-}$ expostos durante 1 h de LDLox conjugada com FITC. Foi analisada a fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina para varios tempos. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0,001$; $**p<0,01$; $*p<0,05$.

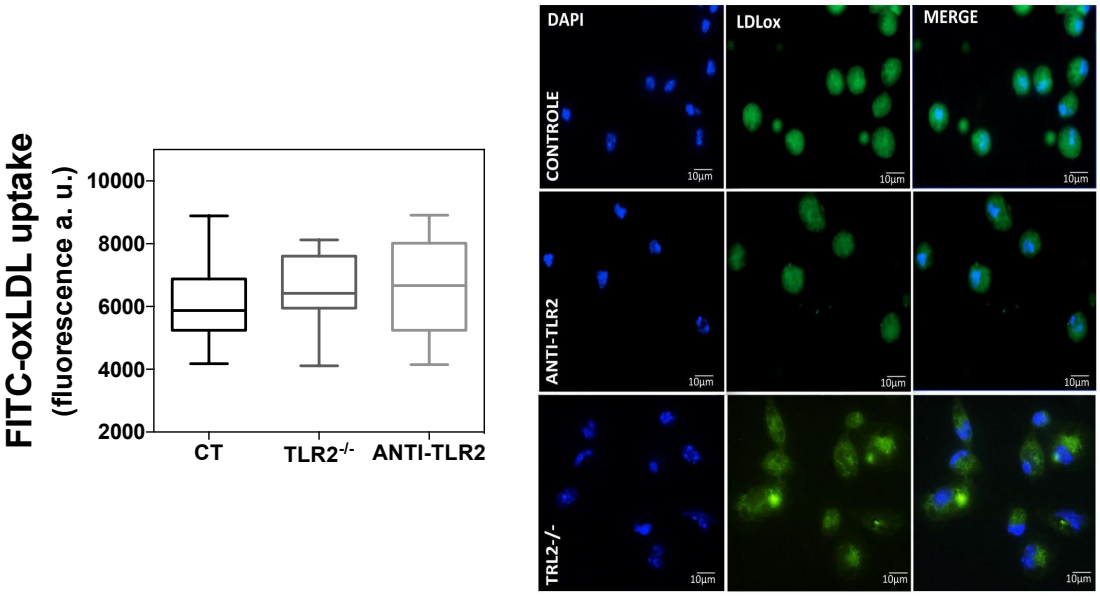


Figura 18 – Participação do receptor TLR2 na captação aguda de LDLox em macrófagos

Efeito da deleção ou bloqueio do TLR2 na captação de LDLox (50 μg/ml) por macrófagos durante 1 h de estímulo. Resultados obtidos em macrófagos de camundongos controle pré-tratados com anti-TLR2 (1:50) e $TLR2^{-/-}$ expostos durante 1 h de LDLox conjugada com FITC. Foi analisada a fluorescência no canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula em pelo menos 5 campos fotografados de cada lâmina para varios tempos. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0,001$; $**p<0,01$; $*p<0,05$.

4.2.3 Mecanismo de regulação da captação via TLR4 pela nNOS

Trabalhos sugerem participação da ERK na via de ativação da cascata que leva a captação de LDL minimamente oxidada por macropinocitose via TLR4. A participação da ERK e da JNK, também envolvida, foi avaliada pela pre-incubação dos macrófagos com os inibidores da ERK e da JNK (PD e JNKI ; 10 μ/mol). Após incubação com LDLox observou-se uma diminuição da captação pela inibição das duas quinases , sendo maior a participação da ERK (Figura 19). Ao avaliar a fosforilação da ERK e JNK evidenciou-se que a ERK foi fosforilada logo após 5 minutos de exposição a LDLox, enquanto que a JNK manteve os níveis de fosforilação inalterados (Figura 19). Estes resultados sugerem que é a ERK a responsável pela sinalização dos macrófagos para iniciar o processo de macropinocitose para captar formas oxidadas de LDL mediadas pelo TLR4.

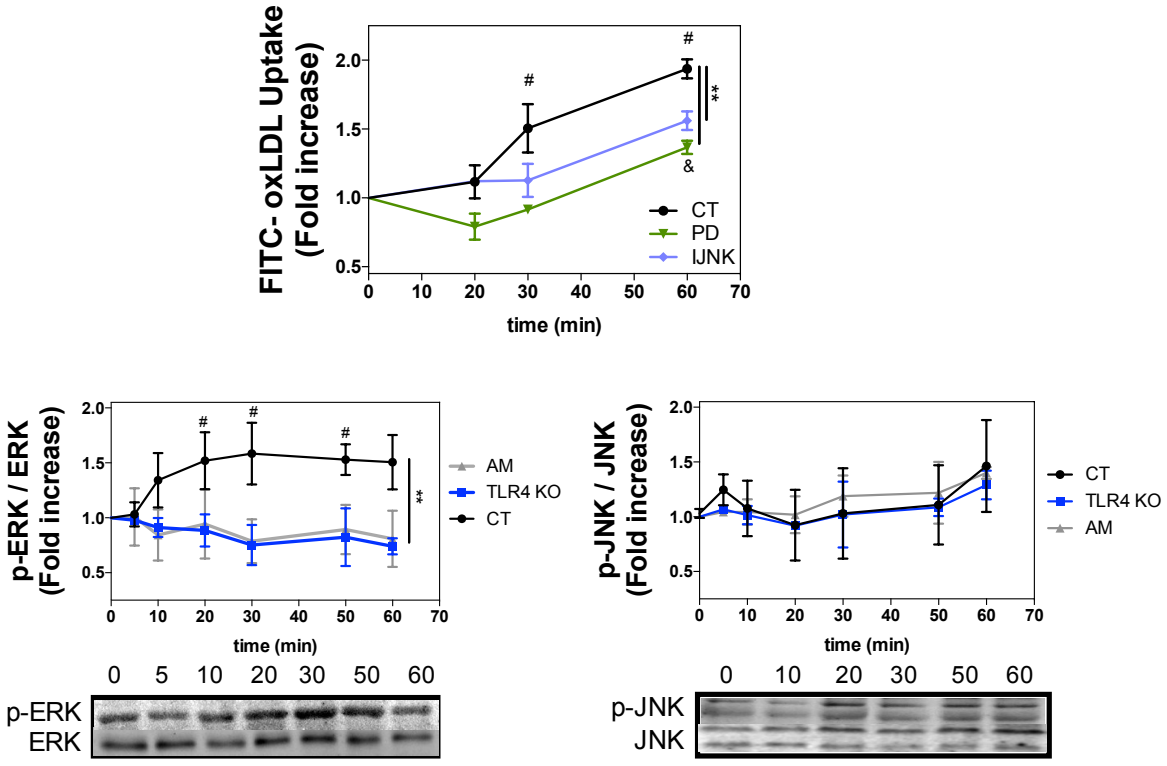


Figura 19 – Papel da ERK e JNK na captação rápida de LDLox em macrófagos

Participação das quinases ERK e JNK na captação aguda de LDLox em macrófagos. Painel superior, resultados de captação obtidos em macrófagos pré-incubados com os inibidores da ERK e JNK (PD, JNKI; 10μM) e expostos por 1 h a LDLox. Painel inferior, resultados de atividade da ERK e JNK em macrófagos incubados com LDLox por 1 hora normalizados pela expressão total da ERK e JNK ao longo de 1 hora de exposição em células controle pré/tratadas com AM (1μM) e de camundongos $TLR4^{-/-}$. Os resultados foram expressos como média±EPM de pelo menos 4 experimentos independentes. $***$p<0,001; $**$p<0,01; $*$p<0,05.

4.2.3.1 Captação via Macropinocitose

Para confirmar se a LDLox estava sendo endocitada via macropinocitose, pre-incubamos os macrófagos com Latrunculina A (LaT A), um inibidor da polimerização de actina. A captação de LDLox foi reduzida pelo tratamento com LaT A. Adicionalmente, o efeito do doador de Oxido Nítrico e do inibidor da nNOS foi abolido nos macrófagos pre-incubados com LaTA (Figura 20) indicando que a captação rápida de LDLox induzida pelo TLR4 poderia estar ocorrendo via macropinocitose.

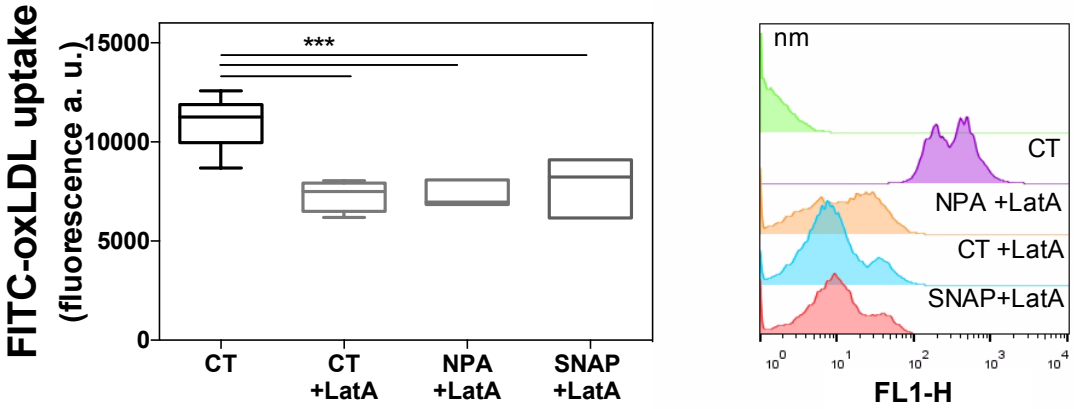


Figura 20 – Captação rápida de LDLox via macropinocitose em macrófagos

Participação da polimerização e reorganização de filamentos de actina, pela pré-incubação com LaTA(5 μM), na captação aguda de LDLox em macrófagos co-incubados ou não com o inibidor da nNOS; NPA(100 nM) e o doador de NO; SNAP(300 μM). Fluorescência do FITC de cada célula no canal FL-1 foi analisada por citometria de fluxo de pelo menos 15000 eventos de cada experimento. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. $***p<0{,}001$.

O processo de macropnocitose pode ocorrer induzido pela LDL minimamente modificada (mmLDL) via receptor TLR4. Neste trabalho observou-se que a LDLox foi capaz de induzir polimerização de actina e rearranjos tipo formação de macropinosomos. A inibição da nNOS induziu um aumento na polimerização de actina e rearranjos na membrana. A participação do NO derivado da nNOS foi confirmada pela incubação com SNAP que preveniu a polimerização de actina e os rearranjos de membrana dos macrófagos (Figura 21). Macrófagos dos animais $TLR4^{-/-}$ mostraram um nível basal alto no conteúdo de actina, embora, nenhum dos tratamentos, a inibição da nNOS ou doação de NO de forma exógena, mudou a composição de actina. Estes resultados adicionaram evidencia da relação do TLR4 com o NO produzido pela nNOS.

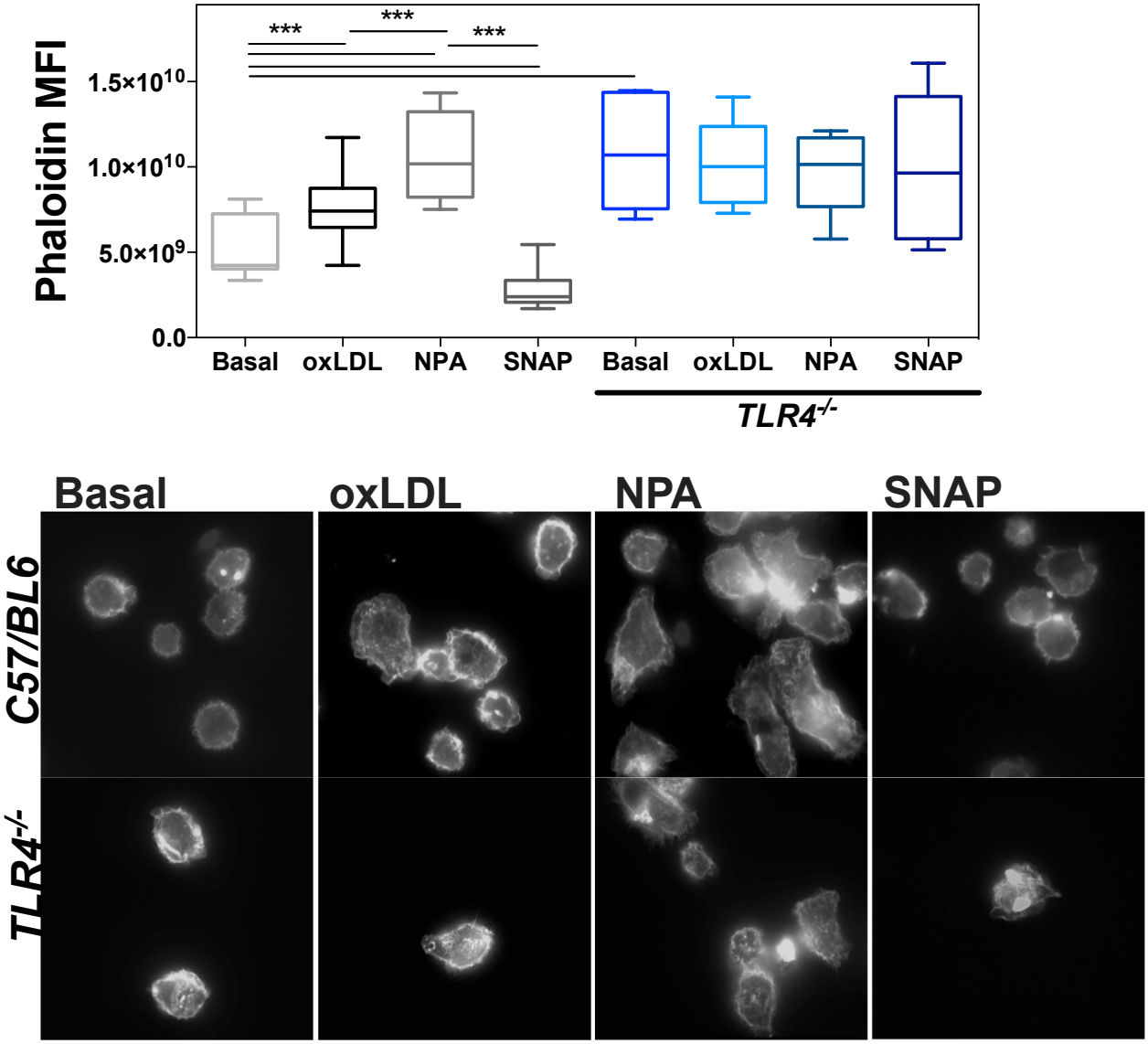


Figura 21 – Polimerização e rearranjos de actina durante exposição à LDLox em macrófagos

Polimerização e rearranjos de filamentos de actina evidenciados pela marcação com faloidina conjugada com alexa488 em macrófagos controle (57BL6/J) e $TLR4^{-/-}$ expostos a 1 hora de LDLox (50 μg/mL) e pré-incubados por 30 min com NPA(100 nM) ou SNAP(300 μM). mesuração do conteúdo de faloidina por fluorescência do canal do FITC corrigida pelo tamanho de cada célula. Imagens capturadas por microscopia de fluorescência e analisada de pelo menos 5 campos de cada lâmina. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos separados. $***$p<0,001.

4.3 Ativação rápida da nNOS via TLR4

4.3.0.1 Efeito do antagonismo ou deficiência do TLR4 na produção de NO

Passamos a avaliar a produção de NO via nNOS na presença de amitriptilina, antagonista do TLR4, e em animais *knockout* para TLR4 . A amitriptilina assim como a deficiência do

TLR4 reduziu a produção de NO (Figura 22) tanto pela estimulação com LDLox, como quando o superoxido foi dismutado pela co-incubação com SOD. A amitriptilina assim como a deficiência do TLR4 também reduziram a produção de superoxido evidenciado pela marcação com DHE (Figura 22). Estes resultados sugerem que o TLR4 estaria ativando a nNOS. Baseados neste resultado, investigamos os níveis de fosforilação da nNOS na presença da amitriptilina e em macrófagos deficientes para TLR4.

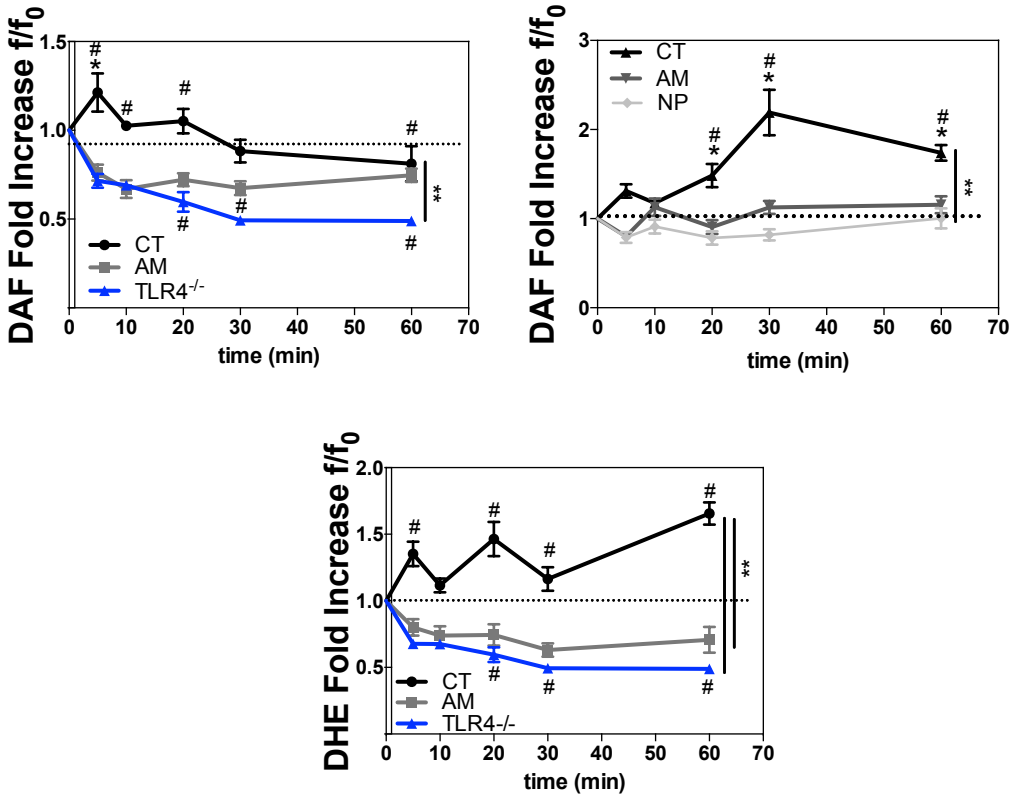


Figura 22 – Participação do TLR4 na produção rápida de NO em macrófagos

Efeito do bloqueio ou deleção do TLR4 na produção de NO. Painel superior, cinética de NO durante 1 hora de exposição à LDLox em células controle, incubadas com amitriptilina e $TLR4^{-/-}$. No painel a direita co-incubadas ou não com NPA e pré-tratadas com SOD (300 U/mL) 30 minutos antes dos tratamentos. Painel inferior, dosagem de superoxido após uma hora de estímulo de LDLox de células controle e tratadas com amitriptilina ou $TLR4^{-/-}$. Fluorescência do canal FL1 para NO e FL2 para superóxido foi analisada. Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 6 experimentos independentes. Foram analisados 15.000 eventos de fluorescência a cada experimento. $*p<0{,}05$.

4.3.0.2 Efeito do antagonismo ou deficiência do TLR4 na ativação da nNOS

O antagonismo com amitriptilina ou a deleção do TLR4 não alterou os níveis de fosforilação no sítio de ativação da nNOS (nNOSser1417), mas apresentou uma diminuição destes em alguns pontos no tempo (Figura 23). Por outro lado a amitriptilina ou a deleção gênica do TLR4 diminuíram os níveis de fosforilação no sítio de inativação (nNOSser852)

(Figura 23). Desta forma, pudemos inferir que o estímulo dos receptores TLR4 pela LDLox leva à parcial fosforilação da nNOSser1417 e desfosforilação da nNOSser852 e consequente indução da atividade e pequena produção de NO.

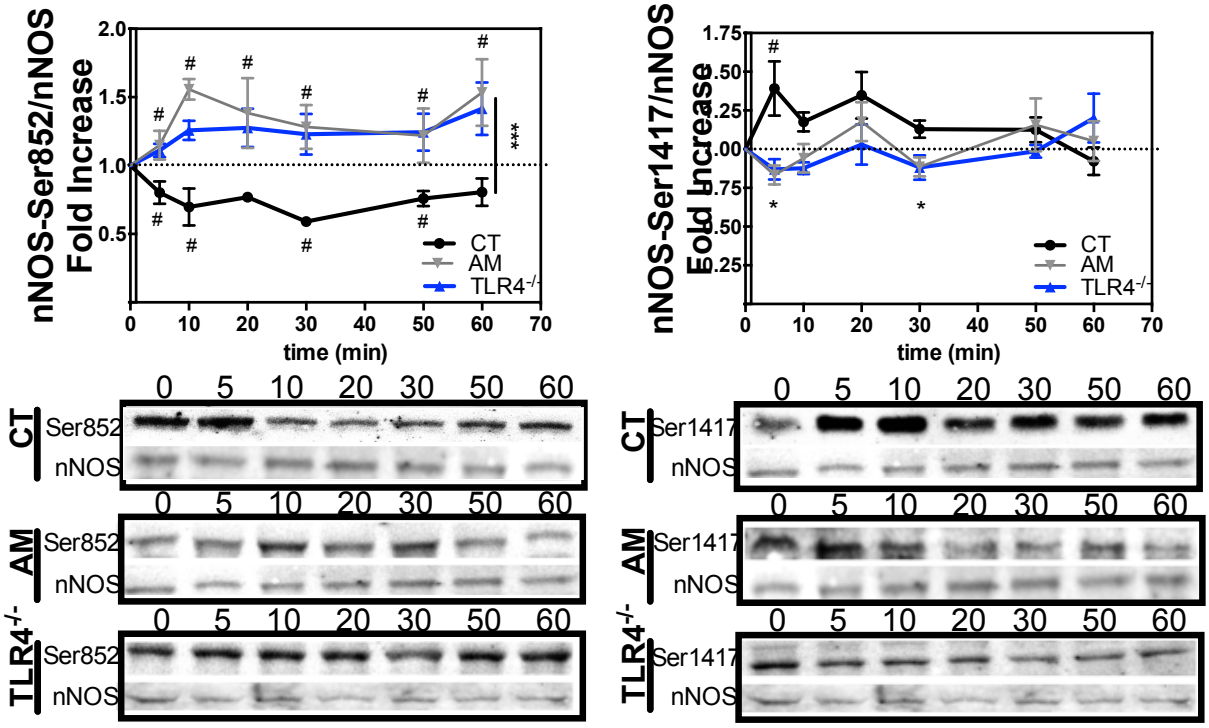


Figura 23 – Participação do TLR4 na ativação da nNOS em macrófagos

Efeito do antagonismo ou deleção do TLR4 sobre os níveis de fosforilação da nNOS nos resíduos ser852 e ser1412, por Western blot durante uma hora de estímulo com LDLox. Painel a esquerda, Fosforilação dos sítios Ser852 em células controle pré-incubadas com amitriptilina e em células *knockout* para o TLR4 durante 1 hora de exposição com LDLox. Painel direito, Fosforilação dos sítios Ser1412 em células controle pré-incubadas com amitriptilina e em células *knockout* para o TLR4 durante 1 hora de exposição com LDLox. Os resultados dos níveis de fosforilação foram normalizados pela nNOS total e expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. $*p<0{,}05$.

4.4 Vias envolvidas na ativação da nNOS pelos TLR4 em macrófagos

4.4.1 Principais vias na produção de NO e captação

Não são claras as vias envolvidas na ativação da nNOS em macrófagos. Avaliamos aqui algumas vias envolvidas na ativação da nNOS em outros modelos. Utilizamos antagonistas de algumas vias como a PI3K/AKT (LY294002, 10 μM/L) e a PKA (H89, 10 μM/L). O H89 reduziu a produção de NO, sugerindo que a principal via envolvida na ativação da

nNOS neste modelo é a PKA e a inibição da PI3K não alterou a resposta (Figura24A). Da mesma forma, somente a inibição da PKA com o H89 aumentou a captação de LDLox pelos macrófagos (Figura 24B).

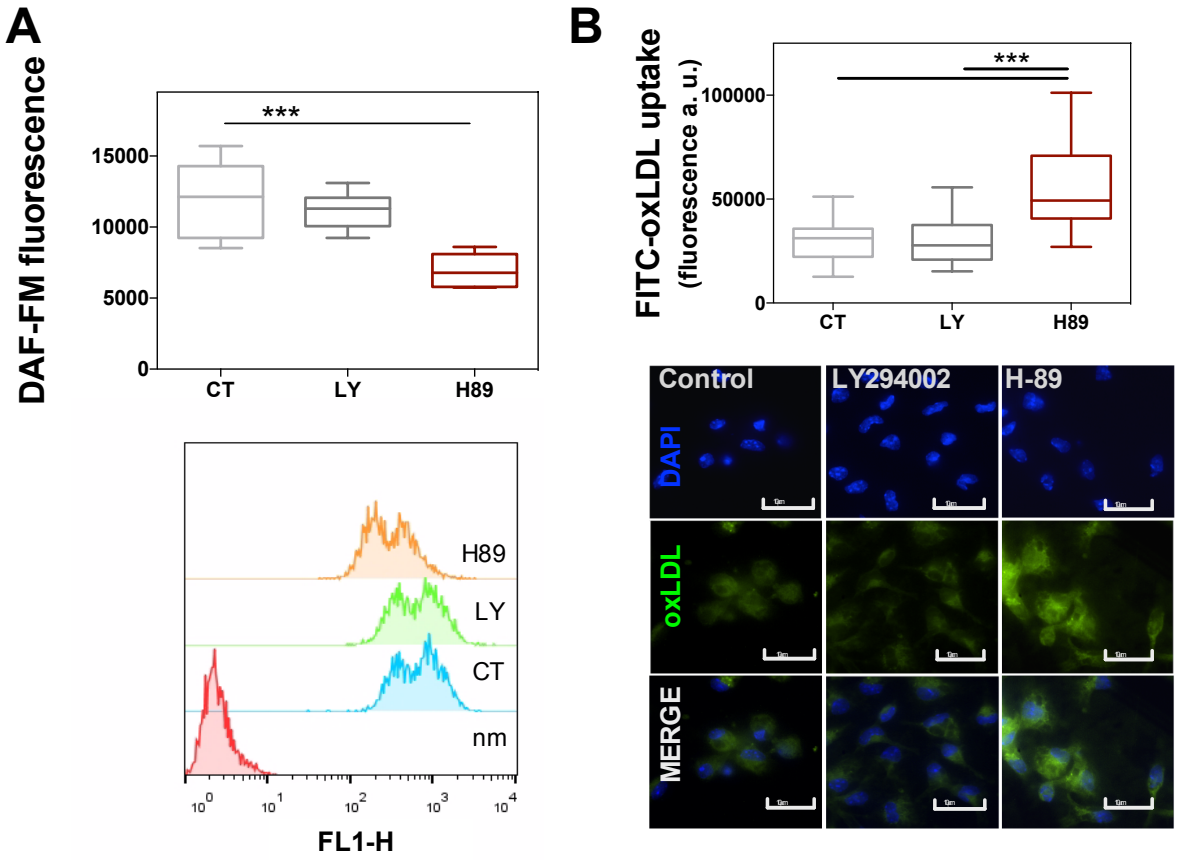


Figura 24 – Participação da PKA na produção de NO e na captação de LDLox em macrófagos

(A) Dosagem de NO em células controle estimuladas com LDLox e pré-incubadas com H89 (10 μM) e LY294022 (10 μM). Foi analisada a fluorescencia do canal FL1. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes. Foram analisados 15.000 eventos de fluorescência a cada experimento.(B) Captação de LDLox na presença de H89 (10 μM) e LY294022 (10 μM). Foi analisada a fluorescência do canal do FITC e corrigida pelo tamanho de cada célula de pelo menos 5 campos fotografados de cada experimento. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes.

4.4.2 Papel do cálcio na internalização e sinalização do TLR4

Tendo em vista que a nNOS é uma enzima ativada por cálcio e a PKA é uma importante enzima no controle do cálcio intracelular, e que a internalização do TLR4 é dependente de cálcio reticular, avaliamos a mobilização de cálcio em macrófagos após ativação de TLR4.

O influxo de cálcio a partir do meio extracelular foi avaliado pelo uso da sonda fluorescente sensível ao cálcio citoplasmático fluo4-AM. O estímulo por 1h com LDLox levou a um influxo transiente de cálcio nos primeiros 30 minutos, o qual é bloqueado pela amitriptilina ou pela ausência do TLR4 (Figura 25). O influxo de cálcio também foi inibido pela inibição da PKA com o H89 e da PLC com o PMSF (Figura 25-Direita). A concentração de cálcio no retículo endoplasmático foi avaliada pelo uso da sonda fluorescente sensível ao cálcio no retículo fluo5-N. O tratamento com LDLox induziu liberação de cálcio do retículo (Figura 25 - painel inferior), que foi bloqueado nos animais $TLR4^{-/-}$, pelo uso da amitriptilina e pela inibição da PLC nos animais controle. A inibição da PKA aumentou o armazenamento de cálcio no retículo (Figura 25). Estes resultados indicam liberação de cálcio do retículo pela ativação da PLC e subsequente produção de PIP3 seguido pela ativação da PKA que aumenta o influxo de cálcio na célula, sugerindo sinalização do TLR4 independente de MyD88.

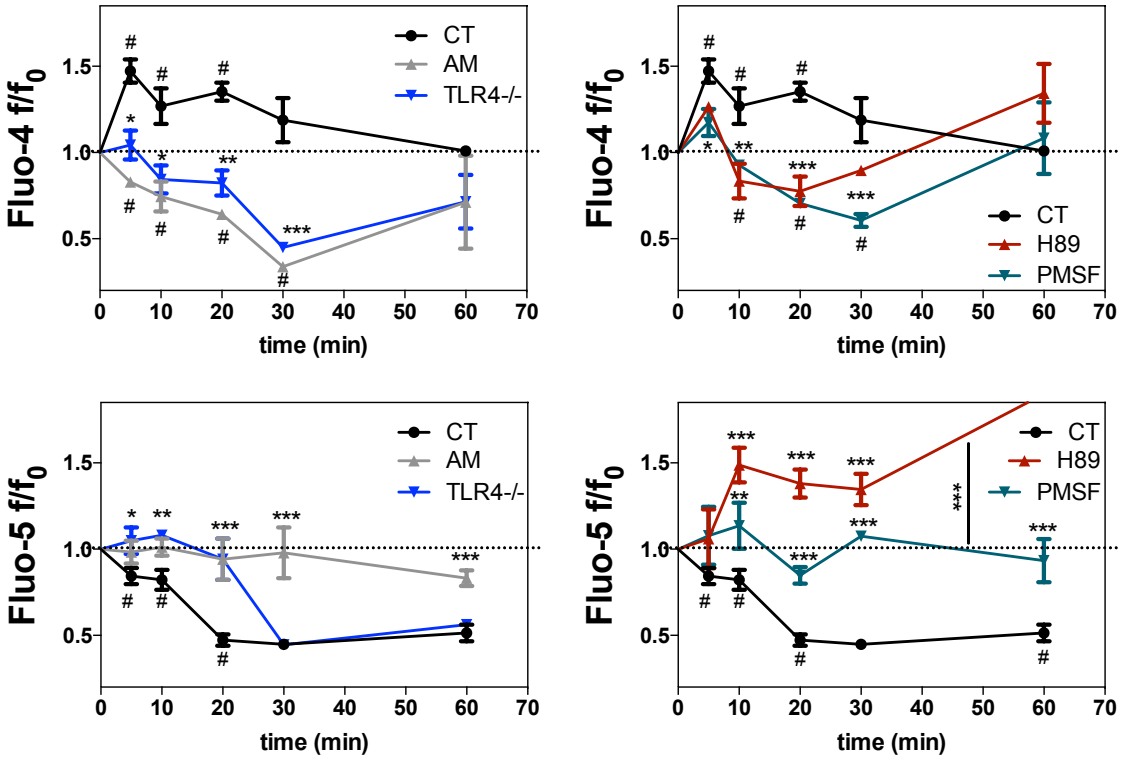


Figura 25 – Mobilização do cálcio durante a captação de LDLox em macrófagos

Influxo de Cálcio celular e do retículo endoplásmatico em macrófagos controle e $TLR4^{-/-}$ durante 1 hora de estímulo com LDLox. Paneis superiores, influxo de cálcio extracelular, medido pela sonda Fluo-4 na presença de amitriptilina (1 μM), H89 (10 μM) e PMSF. Paneis inferiores, Efluxo de cálcio reticular medido pela sonda Fluo-5N na presença de amitriptilina (1 μM), H89 (10 μM) e PMSF. Medidas de fluorescência do canal FL1 foram realizadas. Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 6 experimentos independentes. Foram analisados 15.000 eventos de fluorescência a cada experimento.

4.4.3 Participação da PKA na ativação da nNOS em macrófagos

Como a ativação da PKA mostrou-se um evento importante para a mobilização de cálcio nos macrófagos estimulados com LDLox, avaliamos a participação da PKA na ativação da nNOS pela LDLox. Curiosamente, a inibição da PKA aumentou a fosforilação em nNOSser852 (Figuras 26).

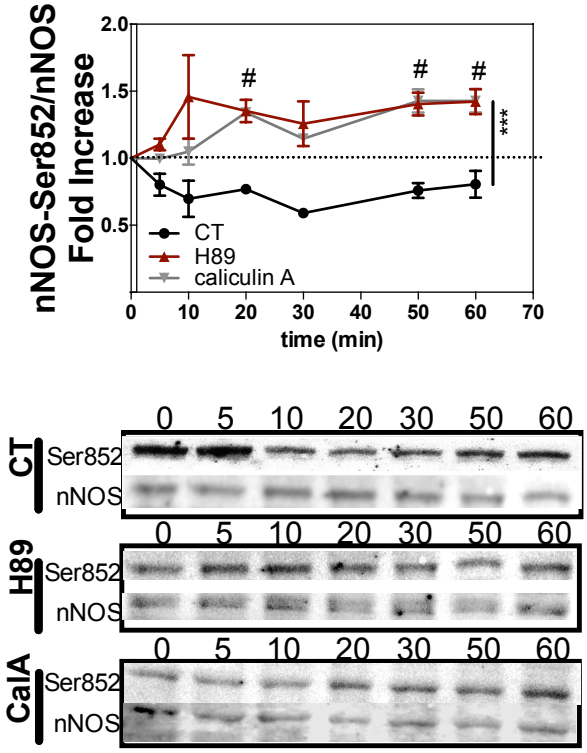


Figura 26 – participação da PKA na ativação da nNOS em macrófagos

Efeito da inibição da PKA sobre os níveis de fosforilação da nNOS nos resíduos ser852 por Western blot durante uma hora de estímulo com LDLox(50 μg/mL). Fosforilação dos sitios Ser852 em células controle pré-incubadas com H89 (10 μM) e Calyculina A (10 nM) por 30 minutos. Os resultados dos níveis de fosforilação foram normalizados pela nNOS total e expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. $*p<0{,}05$

4.4.4 Participação da PP1 na ativação da nNOS

Trabalhos sugerem a participação da fosfatase PP1 na regulação da atividade da nNOS. tendo em vista isto avaliamos a translocação da PP1 do núcleo pro citoplasma, como indicador de atividade da PP1. A LDLox induziu uma diminuição da proporção de PP1 no núcleo e aumentou no citoplasma, indicando maior translocação desta. Esta resposta foi inibida pela co-incubação com H89 sugerindo dependência da PKA (figura 27).

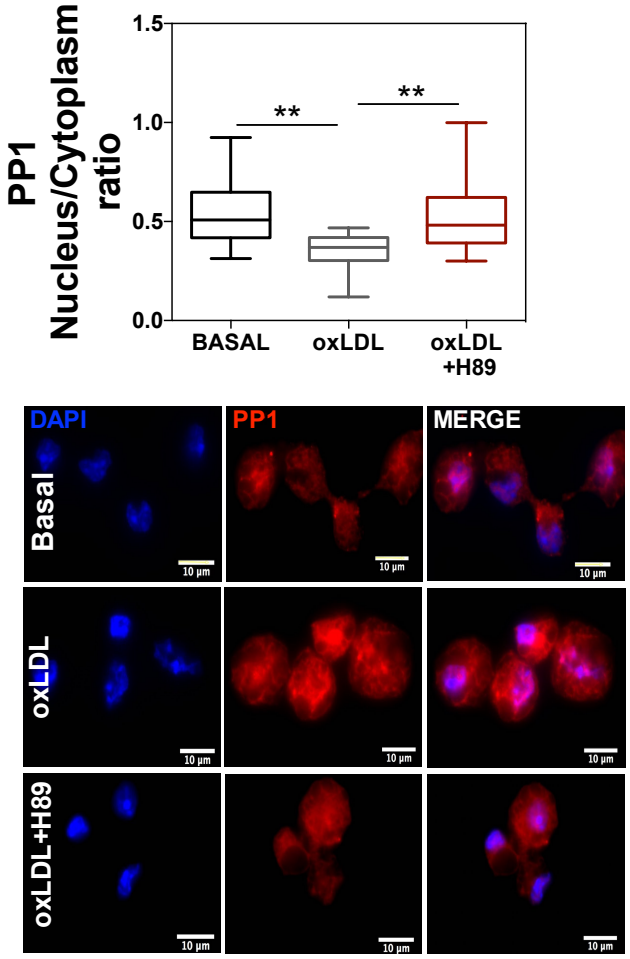


Figura 27 – Translocação da PP1 dependente da PKA em macrófagos

Translocação da PP1 em macrófagos estimulados com LDLox (50 μg/mL) por uma hora. Macrófagos sem estímulo ou pré-incubados com H89 foram estimulados por 1 hora com LDLox e marcados com anticorpo anti-PP1 e anticorpo secundario anti- IgG de camundongo-alexa 633 e visualizados por microscopia de fluorescência. Fluorescência no filtro 647 nm, corrigida pelo tamanho de cada núcleo e citoplasma de cada célula foi analisada de pelo menos 5 campos fotografados por lâmina de cada experimento. Os resultados foram expressos como mediana e quartis em diagrama de caixa de pelo menos 4 experimentos independentes.

Seguidamente avaliamos o efeito da PP1 sobre a fosforilação dos sítios Ser852 da nnNOS. Assim como com a PKA a inibição da PP1 com Calyculina A não alterou os níveis de fosforilação do sitio Ser1417 e aumentou os de Ser852 durante uma hora (figura 26).

4.4.5 *Crosstalk* entre TLR4 e nNOS

Os resultados até aqui apresentados sugerem uma forte comunicação entre as vias clássicas da nNOS e do TLR4. Como existem várias evidencias funcionais de interações

proteína-proteína envolvendo o TLR4, decidimos avaliar se existem interações físicas ou somente *crosstalk* entre as vias intracelulares de sinalização da nNOS e TLR4.

4.4.6 Colocalização da nNOS e TLR4

Experimentos de imunofluorescência para dupla marcação de TLR4 e nNOS foram realizados para se inferir a colocalização de ambas, nNOS e TLR4. O primeiro passo foi avaliar o grau de colocalização em lesões ateroscleróticas de camundongos $apoE^{-/-}$. A análise do coeficiente de correlação de Manders mostrou uma grande correlação entre a marcação para nNOS e TLR4 na parede dos vasos, que não foi alterada nas lesões da parede de carótidas ocluídas (Figura 28A). A partir de então, resolvemos avaliar o nível de correlação em macrófagos isolados. Assim como na placa, pudemos observar forte correlação entre a marcação da nNOS e TLR4 no basal e um aumento após estímulo (Figura 28B). Estes dados, apesar de serem apenas um indicio (dado que analise de colocalização por epifluorecência não é confiável), sugerem que além de interação entre as vias, pode existir uma interação física entre estas proteínas.

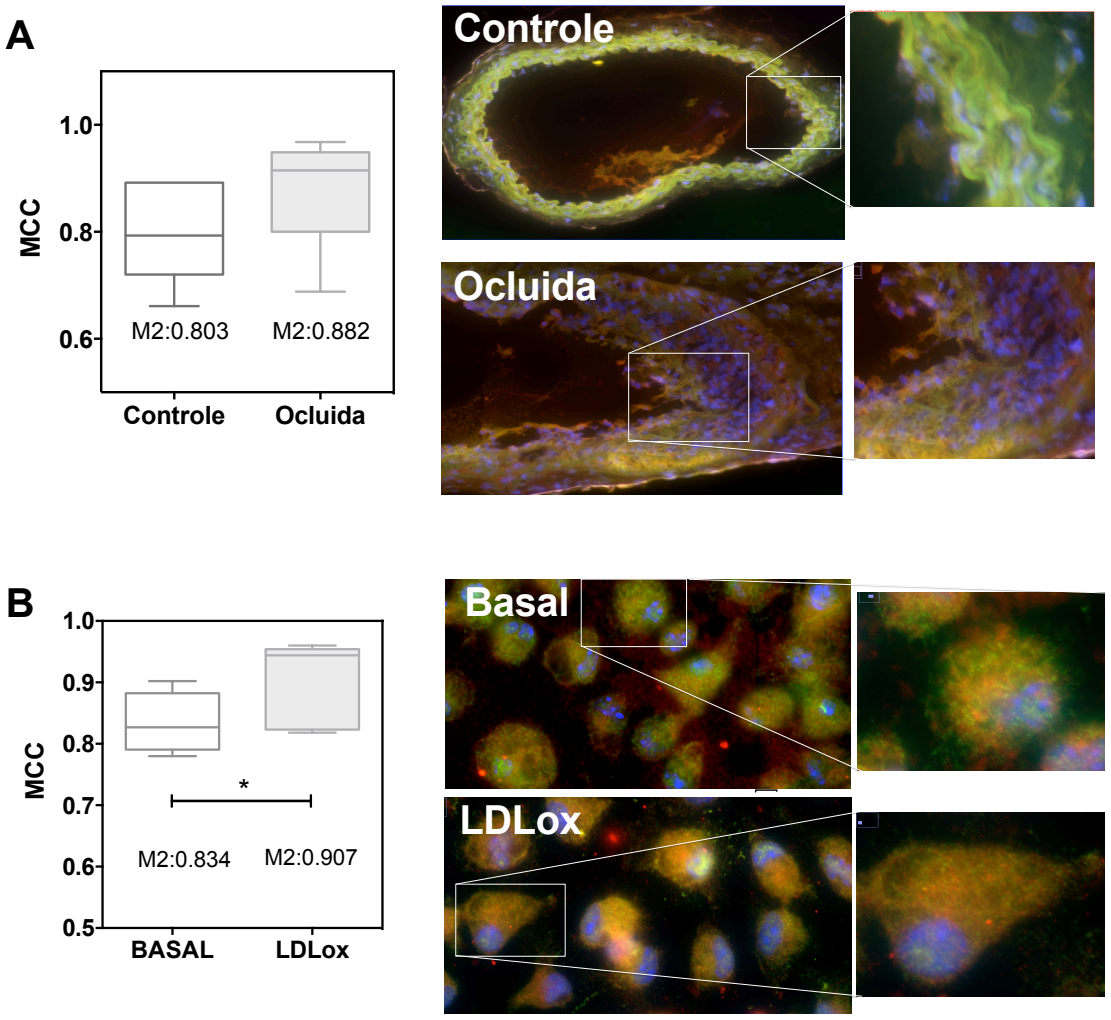


Figura 28 – Superpossicão de nNOS e TLR4

Co-localização de nNOS e TLR4 em (A) em lesões ateroscleróticas de camundongos apoE-/- e em (B) macrófagos murinos estimulados com LDLox por 1 hora. mediana do coeficiente de correlação de Manders (M2) de 4 experimentos independentes representa a proporção de sinal da marcação verde (alexaFluor-488 anti-nNOS) que colocaliza com a marcação vermelha (AlexaFluor-633 anti-TLR4) em carótida controle e ocluída(A) e em macrófagos peritoniais estimulados com LDLox por 1 hora, independente da intensidade de marcação. costes p-value= 1.00 $*p<0{,}05$.

4.4.7 Interação física nNOS-TLR4

Baseados nos dados anteriores sugestivos de interação nNOS-TLR4, realizamos experimentos de co-imunoprecipitação. A análise da expressão de nNOS em amostras imunoprecipitadas com anticorpo anti-TLR4 mostraram que a nNOS apresenta interação com o TLR4 em situação controle, e o estímulo com LDLox ou LPS parece diminuir a interação (Figura 29).

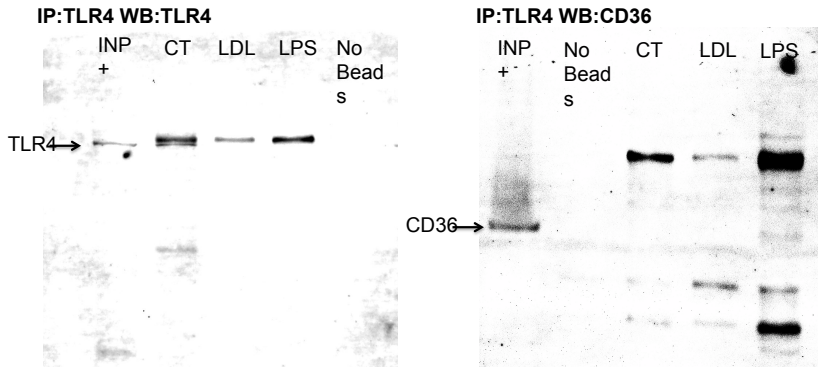


Figura 30 – Independência do TLR4 do CD36

Esquerda, WB controle da imunoprecipitaçãp do TLR4, detectando TLR4 em células controle e estimuladas com LDLox (50 μg/mL) e LPS (1 μg/mL) por 1 h. Direita, WB da detecção do CD36 co-imunoprecipitando com o TLR4 em células controle e estimuladas com LDLox (50 μg/mL) e LPS (1 μg/mL) por 1 h.

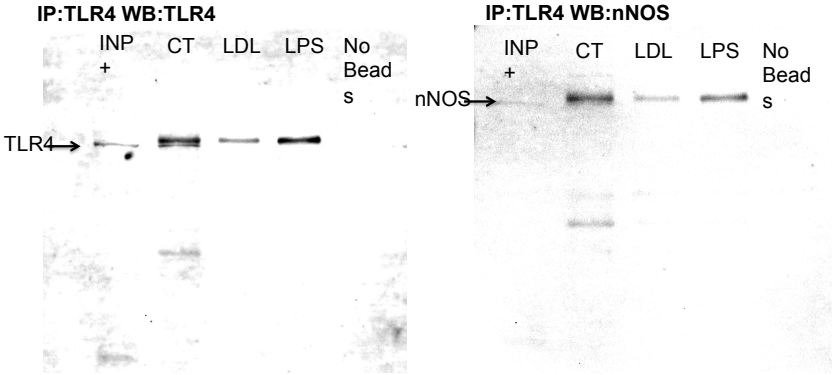


Figura 29 – Co-Imunoprecipitação do TLR4 e a nNOS.

Esquerda, WB controle da imunoprecipitaçãp do TLR4, detectando TLR4 em células controle e estimuladas com LDLox (50 μg/mL) e LPS (1 μg/mL) por 1 h. Direita, WB da detecção da nNOS co-imunoprecipitando com o TLR4 em células controle e estimuladas com LDLox (50 μg/mL) e LPS (1 μg/mL) por 1 h.

Por outro lado, dada a resposta na captação pelo antagonismo do CD36 e trabalhos sugerindo a interação deste receptor com outros receptores incluindo o TLR4, avaliamos a interação do TLR4 com o CD36. Observou-se que não há uma interação do receptor TLR4 com o CD36 (Figura 30).

4.5 Mecanismo de Ativação da nNOS no endotélio

Trabalhos do nosso grupo e outros mostram a importância da nNOS no endotélio vascular. Para validar o mecanismo de ativação da nNOS encontrado em macrófagos,

usamos o modelo de resposta endotelial conhecido à acetilcolina (Ach) mediado pelo NO.

4.5.1 nNOS na função vascular

Curvas concentração-resposta à Ach foram avaliadas em anéis de aorta de animais nos quais foi silenciada a eNOS com ODN-AS. Como descrito na literatura, Ach induziu vasodilatação e esta foi reduzida pela metade nos anéis silenciados para eNOS. A eficiência do silenciamento agudo da eNOS *in vivo* foi confirmada por western blot (Figura 31 A-B). O estímulo com Ach também induziu produção de NO e H_2O_2 nesses anéis; a mesma foi reduzida pela pre-incubação com TRIM (Figura 31C).

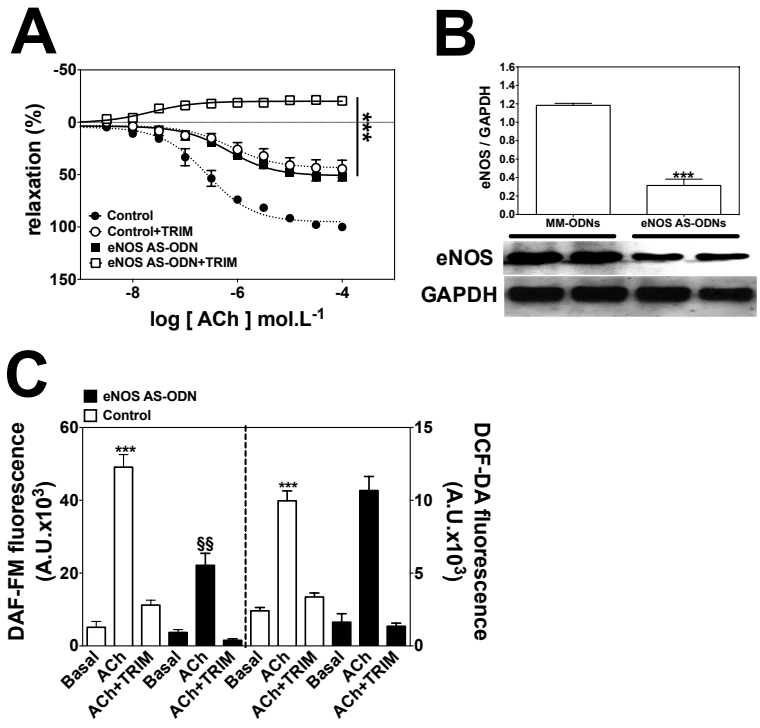


Figura 31 – nNOS na função vascular

(A) Curvas concentração resposta a Ach em anéis de aorta controle e silenciados com AS-ODN para eNOS, tratados ou não com TRIM. (B) Expressão proteica da eNOS em anéis controle e silenciados com AS-ODN para eNOS, normalizados pelo conteúdo de GAPDH.(C) produção de NO e e H_2O_2 medido pelas sondas DAF e DCF em anéis de aorta controle e silenciados com AS-ODN para eNOS, tratados ou não com TRIM. Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. *** $p < 0.001$.

A partir desses resultados foi utilizado 10 μmol de Ach para estimular anéis de aorta e células endoteliais para avaliar a fosforilação no sitio Ser852. Observou-se uma desfosforilação gradual do sitio Ser852 durante 20 min de estimulação em anéis de aorta e em células endoteliais (Figura 32).

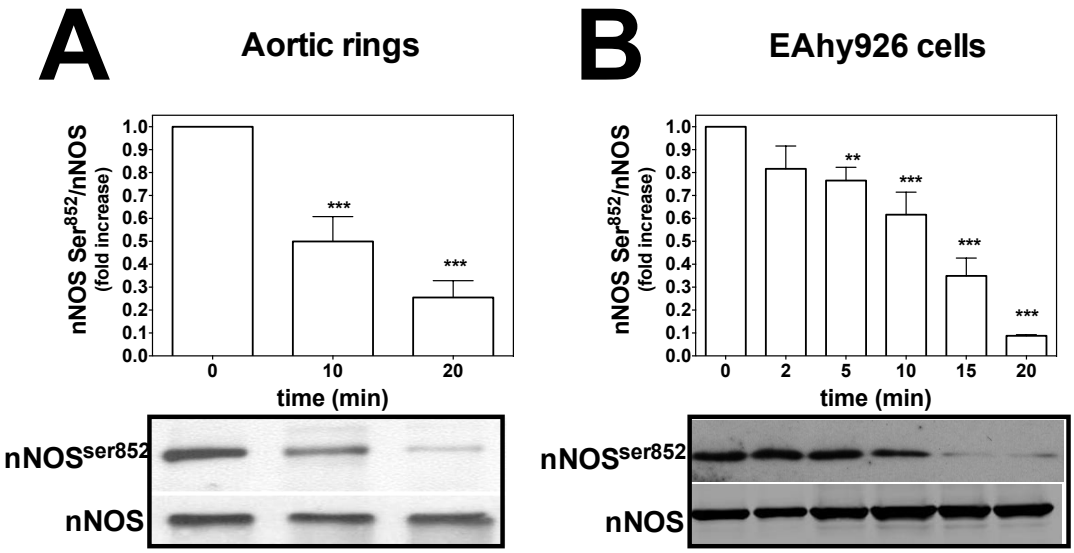


Figura 32 – Atividade da nNOS em células endoteliais e anéis de aorta

Expressão da nNOS fosforilada no resíduo Ser852, normalizado pelo conteúdo de nNOS total em anéis de aorta(A) e células endoteliais(B) expostas durante 20 minutos à Ach (10 μM). Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. *** p< 0.001.

4.5.2 Participação da PP1 na ativação e translocação da nNOS

Para avaliar o papel da PP1 na desfosforilação da nNOS no resíduo Ser852, células endoteliais foram incubadas com inibidores seletivos para PP2 (Cyclosporina A, 10 μM) e não seletivo para PP1 e PP2 (Calyculina A, 1 μM). A pre-incubação com ciclosporina A não mostrou efeito nos níveis de fosforilação do sitio Ser852 em células endoteliais e também não modificou a resposta vaso-relaxante à Ach em anéis de aorta, nos quais foi silenciada a eNOS. Por outro lado, a inibição não seletiva com Caliculina A preveniu a desfosforilação da nNOS-Ser852 em células endoteliais e também aboliu a resposta vasodilatadora à Ach em anéis de aorta nos quais foi silenciada a eNOS (Figura 33). Estes resultados sugerem uma participação da PP1 na ativação da nNOS via desfosforilação da nNOS-Ser852.

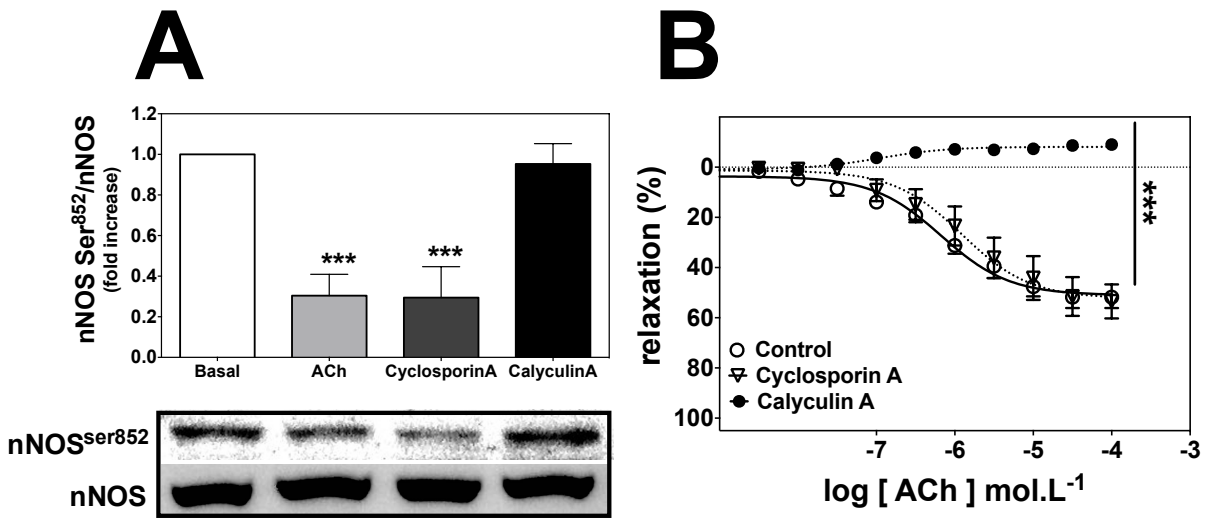


Figura 33 – Participação da PP1 na ativação da nNOSno endotélio

(A) Expressão da nNOS fosforilada no resíduo Ser852, normalizado pelo conteúdo de nNOS total em anéis de aorta estimulados durante 20 minutos com Ach (10 μM), pre-incubados ou não com Ciclosporina A (10 μM) ou Calyculina A (1 μM). (B) Curvas concentração-resposta à Ach em anéis de aorta silenciados com AS-ODN para eNOS, tratados ou não com Ciclosporina A (10 μM) ou Calyculina A (1 μM). Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. *** $p < 0.001$.

A ativação da PP1 foi avaliada pela translocação e pela interação com o inibidor nuclear da PP1, NIPP1. Experimentos de co-imunoprecipitação mostraram que o estímulo com Ach induziu uma redução na interação entre o NIPP1 e a PP1. Adicionalmente, o estímulo de Ach induziu uma translocação do núcleo para o citoplasma e região perinuclear dependente do tempo, indicando um aumento na atividade da PP1 (Figura 34).

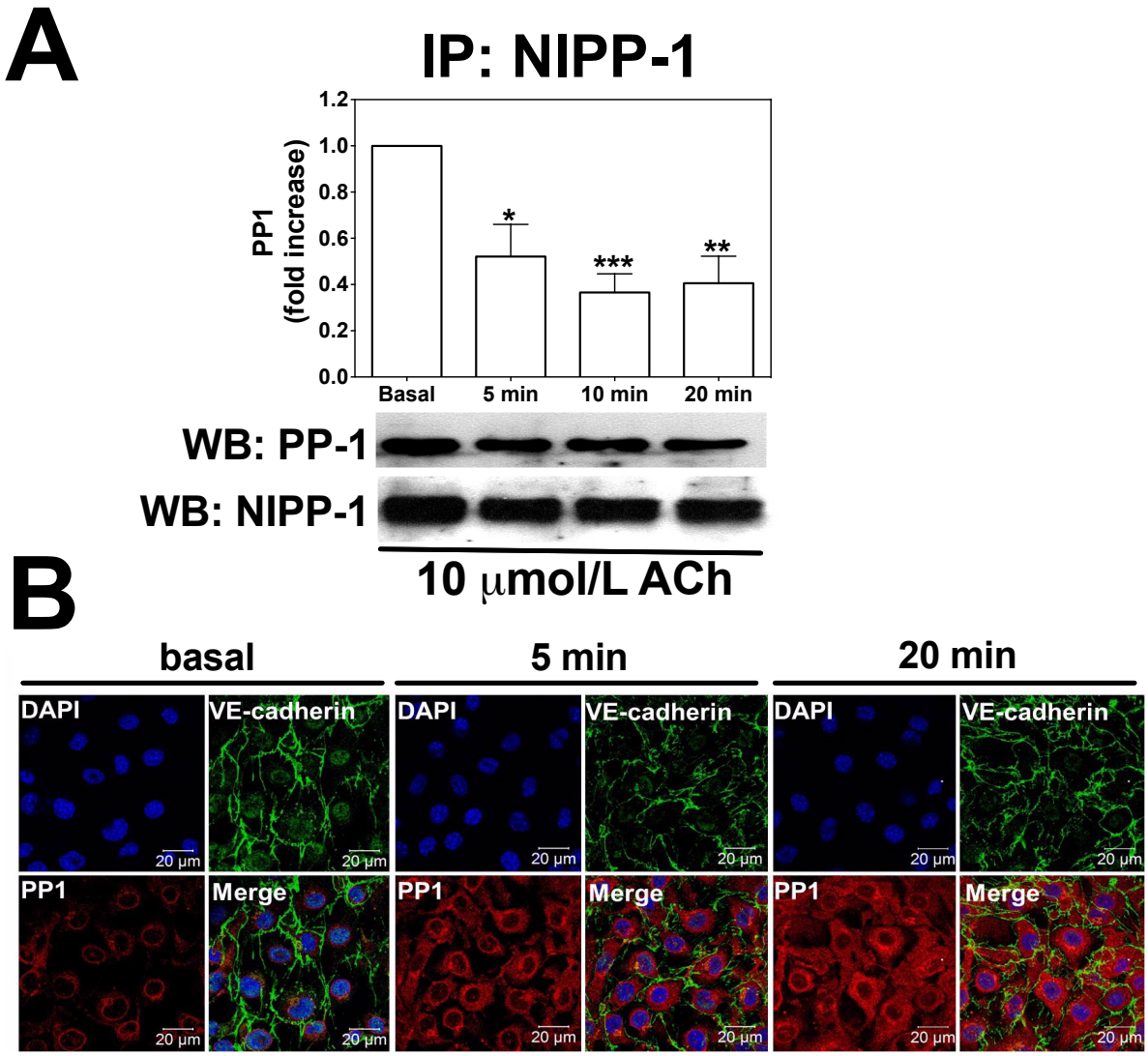


Figura 34 – Ativação e translocação da PP1 em células endoteliais

(A) co-immunoprecipitação do NIPP1 e Expressão da PP1 em células endoteliais estimuladas durante 20 minutos com Ach (10 μM). Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. (B) marcação da PP1 em vermelho por microscopia confocal de células endoteliais durante 5 e 20 minutos de estímulo com Ach (10 μM). DAPI: marcação dos núcleos. em verde: VE-Caderina. *p< 0.05; ** p< 0.005; *** p< 0.001.

4.5.3 Participação da PKA na sinalização

A interação NIPP1/PP1 pode ser reduzida pela fosforilação do NIPP1. Para ver se a PKA poderia induzir a fosforilação do NIPP1 e em consequência induzir dissociação do NIPP1/PP1, foi utilizado o análogo permeável da cAMP, O 8-Br-cAMP que induziu dissociação do NIPP1/PP1 (Figura 35A). O H89 preveniu a translocação do PP1 ao citoplasma (Figura 35B), e a desfosforilação da nNOS-Ser852. O 8-Br-cAMP induziu desfosforilação deste resíduo (Figura 35C).

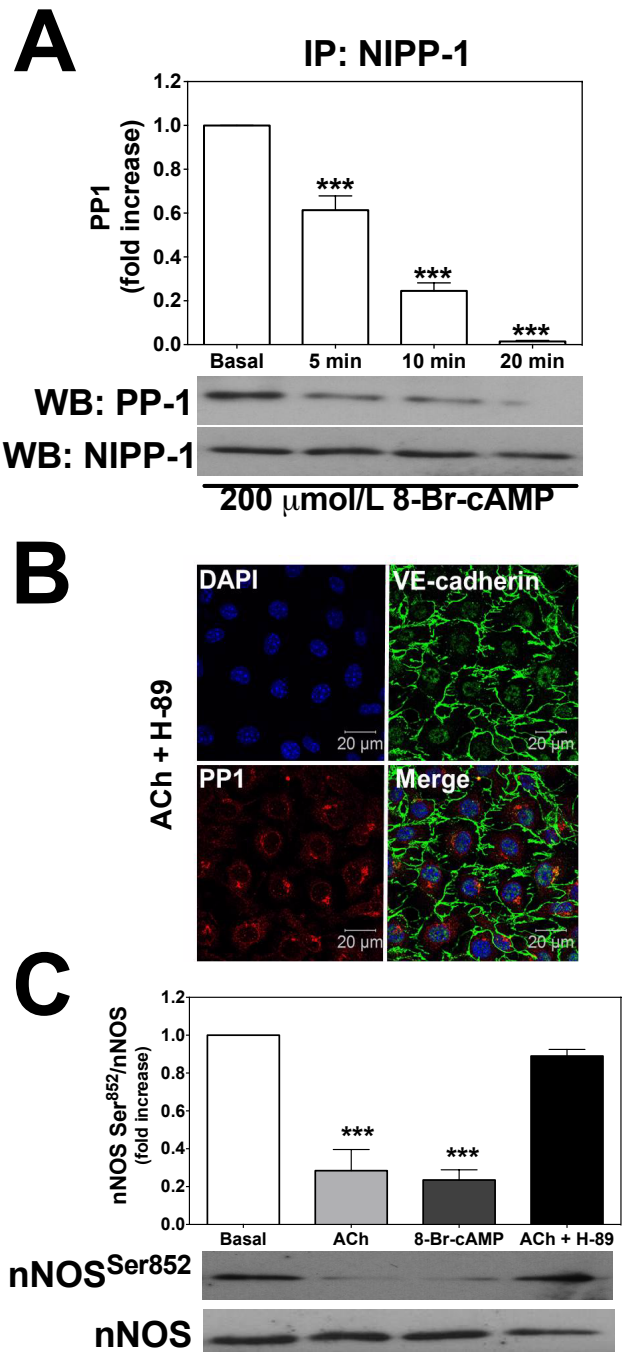


Figura 35 – Participação da PKA na Ativação da nNOS e da PP1 em células endoteliais

(A) co-immunoprecipitação do NIPP1 e Expressão da PP1 em células endoteliais estimuladas durante 20 minutos com 8-Br-AMPc (200 μM). Os resultados foram expressos como média±DP de pelo menos 4 experimentos independentes. (B) marcação da PP1 em vermelho por microscopia confocal de células endoteliais durante 20 minutos de estímulo com Ach (10 μM) e pre-incubados com H89 (10 μM) por 30 minutos. DAPI: marcação dos núcleos. em verde: VE-Caderina. (C)Expressão da nNOS fosforilada no resíduo Ser852, normalizado pelo conteúdo de nNOS total. em células endoteliais estimulados durante 20 minutos a Ach (10 μM), pre-incubados ou não com H89 (10 μM) ou 8-Br-AMPc (200 μM). *** $p < 0.001$.

Experimentos de microscopia confocal mostraram que, sob estímulo com Ach, a nNOS transloca do citoplasma para a região perinuclear e o núcleo. Experimentos preliminares mostram esta migração nos macrófagos após o estímulo com LDLox, sugerindo que após ativação a nNOS transloca para a região perinuclear. Além disso, a inibição da PKA previne essa translocação da nNOS, confirmando o papel da PKA na ativação da enzima. (Figura 36)

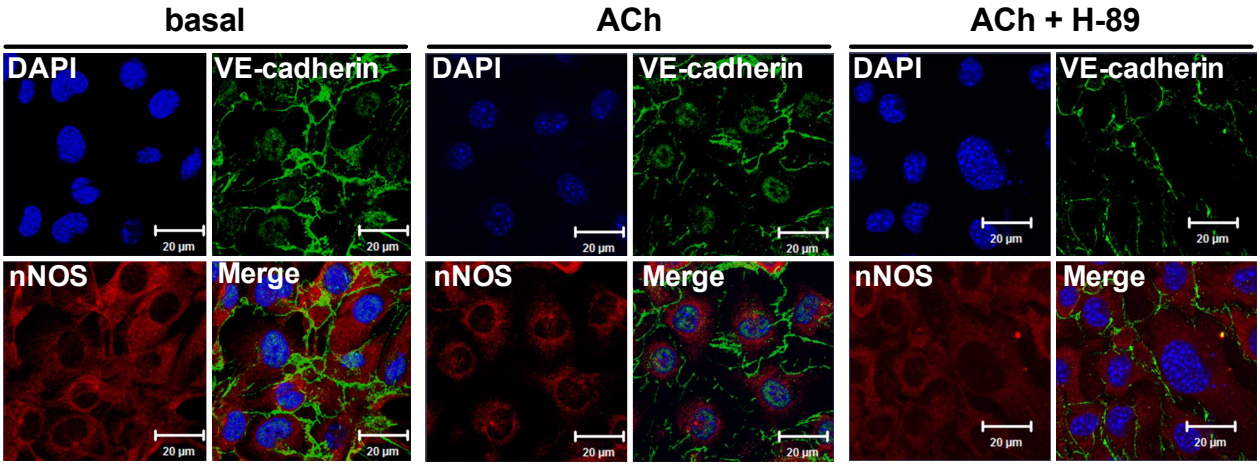


Figura 36 – Participação da PKA na translocação da nNOS

Marcação da nNOS em vermelho, por microscopia confocal, de células endoteliais durante 20 minutos de estímulo com Ach (10 μM) e pre-incubados ou não com H89 (10 μM) por 30 minutos antes do estímulo com Ach. DAPI: marcação dos núcleos. em verde: VE-Caderina.

5 Discussão

5.1 Ativacão da nNOS pelo TLR4 na regulação da captação de LDLox em macrófagos

Neste trabalho, nós demonstramos que o NO exógeno ou derivado da nNOS é capaz de controlar a captação de LDLox em macrófagos. Ainda, demonstramos que o a nNOS regula a captação de LDLox interferindo no processo de macropinocitose induzido pelo receptor TLR4. Adicionamos evidencia que confirma o papel importante do TLR4 na captação rápida de LDLox. Mostramos que a ativação do TLR4 pela LDLox leva à ativação da nNOS por um mecanismo que envolve mobilização de cálcio e desfosforilação do resíduo ser852 via PP1 que por sua vez depende da PKA. Juntos, estes resultados demonstram um novo mecanismo de retroalimentação, no qual a sinalização do TLR4 induzida pela LDLox, aumenta a produção de NO derivado da nNOS para prevenir maior captação da LDLox pelos macrófagos.

Vários trabalhos têm demonstrado a importância de enzimas envolvidas na manutenção do status oxidativo das células no fluxo lipofágico e por conseguinte no acumulo de lípidos dentro das células (YANG et al., 2015), (JEONG et al., 2017), (HUANG et al., 2014) . Em trabalhos anteriores, nosso grupo evidenciou que há uma correlação entra a dislipidemia (níveis de LDLox) e o comprometimento da atividade da isoforma neuronal da NOS, diminuindo assim a biodisponibilidade do NO (NAVIA-PELAEZ et al., 2017) , (CAPETTINI et al., 2011). Aqui, nós provemos evidencia de que o NO é responsável direto pela redução da captação de LDLox em macrófagos, dado que doar NO de forma exógena, assim como prevenir a inativação do NO pelos radicais superoxido, leva à uma redução da captação de LDLox (Figura 3, 4 e 9). O fato de utilizar um modelo *in vitro*, permite-nos hipnotizar que esta redução da captação é diferente do possível efeito antioxidante do NO na prevenção da oxidação de partículas de LDLox. O peróxido de hidrogênio, também produzido pela nNOS, tem um papel dual no controle de diversas funções fisiológicas e progressão de algumas doenças. Aqui, nós observamos que o H_2O_2 não reduz a captação de LDLox, e que inclusive concentrações altas desta molécula podem aumentar a captação (Figura 3 e 5), provavelmente por limitar mecanismos de efluxo como proposto por Jeong et. al,.(JEONG et al., 2017).

Tem sido descrito que o NO pode controlar a internalização de LDL regulando a proteína adaptadora (ARH) do receptor de LDL (LDLR)(ZHAO et al., 2013). Nós demonstramos aqui que o NO pode também modular a internalização de formas oxidadas da LDL, como

sugerido por Sainani (Gurmukh S. Sainani, 2003) . Mostramos também que o controle da captação rápida de LDLox pelo NO é mediado pela ativação da nNOS, dado que a inibição seletiva desta isoforma, leva um aumento da captação de LDLox, que não ocorre quando inibidas a eNOS e a iNOS (Figura2). Convencionalmente, a iNOS é a isoforma induzida em macrófagos para produzir NO em resposta a um estimulo inflatório. Entretanto, nós demonstramos que o NO produzido em macrófagos estimulados com LDLox por uma hora, provem principalmente da nNOS uma vez que a inibição desta abole a produção de NO (Figura 8) e que os níveis de fosforilação da nNOS corroboram a ativação dela (Figura 10). Estes dados suportam as evidências que sugerem novos papeis dessa isoforma em macrófagos, como o trabalho de Huang et.al, (HUANG et al., 2012b) que indica que ha uma baixa produção de NO dependente da nNOS em macrófagos envolvido no processo de fagocitose. Outros trabalhos indicam a participação da eNOS na ativação e expressão pro-inflamatória em macrófagos (CONNELLY et al., 2003). Juntos, esses resultados indicam que as isoformas constitutivas da NOS, incluindo a nNOS, têm uma função importante em macrófagos e que regulações pós-transcricionais conferem características de tipo induzíveis à estas, como proposto por Mattila et al., (MATTILA; THOMAS, 2014).

A inibição da nNOS ao longo do tempo mostra um perfil diferente sobre a captação de LDLox (figura 1). este feito não depende da citotoxicidade nem da LDLox nem do TRIM. Em consequência, acredita-se que ao longo do tempo a isoforma estaria funcionando de forma diferente. evidencias de desacoplamento da enzima alem de alterações na expressão dela sugerem que a produção de NO e superóxido pela nNOS mudam, gerando estes efeitos (NAVIA-PELAEZ et al., 2017). no caso do desacoplamento a inibição da enzima leva a uma redução do estresse oxidativo, aumentando a biodisponibilidade de NO e assim melhorando ou retardando o status oxidativo que contribui na captação.

A literatura mostra que pode existir uma interação dos receptores que reconhecem a LDLox, como o CD36, com a produção de NO proveniente da eNOS em células vasculares (ISENBERG et al., 2007) . Contudo não há evidencias de uma relação desses receptores com a nNOS. Em macrófagos, nós encontramos que a inibição do receptor CD36 com SAB, não diminui a captação, ao contrário, aumenta a captação rápida de LDLox. Este resultado confirma em parte trabalhos que sugerem que, apesar da importância do CD36 na progressão da aterosclerose, a presença destes não interferiria na formação de células espumosas (MANNING-TOBIN et al., 2009), ou que não é importante nos primeiros passos da captação. Porém, outros trabalhos em linhagens monocíticas humanas mostram que o antagonismo do receptor na primeira hora leva a uma redução da captação de LDLox (RIOS et al., 2013). Nós acreditamos que a expressão do receptor na primeira hora poderia não mudar significativamente em comparação com outros receptores. Contudo, a cinética deste e outros receptores não mudou ao longo de 1 hora de exposição de LDLox (dados não mostrados). Alguns trabalhos sugerem que a ligação do receptor CD36 ao lingante

induz o recrutamento e dimerização de outros receptores como o TLR4 (STEWART et al., 2010) (TRIANTAFILOU et al., 2006) (RUYSSCHAERT; LONEZ, 2015) , sugerindo então um possível mecanismo pelo qual o antagonismo do CD36 com SAB aumenta a captação. Além disso, os níveis de internalização de LDLox foram similares à os de células nas quais foi inibida a nNOS, sugerindo uma possível inibição da nNOS em macrófagos via CD36. Para confirmar esses dados seria importante avaliar a captação com outras concentrações do antagonista ou outras opções de antagonista do receptor.

A expressão do CD36 é dependente do receptor PAF (RIOS; GIDLUND; JANCAR, 2011) e existe dimerização do CD36 com o PAFR para internalizar LDLox e sinalizar a produção de algumas citocinas (RIOS et al., 2013) . Neste trabalho observou-se uma participação do receptor PAF na primeira hora de captação que, como mostrado por Rios et al., 2011, poderia ser o primeiro passo para induzir a participação do CD36 não observada nesse modelo de captação rápida. Embora exista evidência do receptor PAF induzir alguma liberação de NO pela via da iNOS (AGRAWAL et al., 2014) , neste trabalho, a inibição da nNOS não foi alterada pelo antagonismo do PAF (Figura 12). Este resultado indica que pelo menos em macrófagos estimulados com LDLox, o PAFR não induz alterações na via da nNOS.

O grau de oxidação da LDLox também é um fator importante no reconhecimento dessas moléculas oxidadas pelos receptores. A oxidação de LDL nesse trabalho foi uma oxidação média, com $CuSO_4$ por 3.5 horas, que gera uma peroxidação lipídica suficiente para diferenciar a molécula da LDL nativa e modificações do tipo oxPC gerando epítopos mais facilmente reconhecidos por receptores como o TLR4 (MILLER, 2005) (MILLER et al., 2003) ou o PAFR e estes epítopos não são reconhecidos pelo CD36, que reconhece formas de oxidação extensiva da LDLox, ou o receptor SR-A que reconhece formas acetiladas (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010) (Di Pietro; FORMOSO; PANDOLFI, 2016) (KZHYSHKOWSKA; NEYEN; GORDON, 2012) . Em dados não mostrados aqui, observamos que o SR-A não participa nessa primeira hora de captação rápida de LDLox em macrófagos.

A LDL oxidada com nosso protocolo assemelha-se a uma partícula minimamente modificada. Por esta razão, avaliamos a captação mediada pelos receptores do tipo TOLL. Ao avaliar a participação dos receptores TLR4 e TLR2, nós confirmamos e adicionamos evidência da importância do receptor TLR4 na captação de LDLox (Figura 14, 16 e 17) (MILLER, 2005) (YANG et al., 2015) . Além disso, nós propomos antagonismo do receptor com o antidepressivo tricíclico, amitriptilina (AM) para bloquear o TLR4 e prevenir o reconhecimento da LDLox. Como aqui observado, a AM previne a captação de LDLox no mesmo nível que a os macrófagos deficientes do TLR4 e os macrófagos pre-tratados com anticorpo anti-TLR4 (Figura 16). Interessantemente, a deficiência do receptor TLR4 e TLR2 ou o bloqueio com AM, abole o efeito da inibição da nNOS na captação. Ainda, o

bloqueio dos receptores TLR2 e 4 com AM, impede a diminuição da captação mediada pelo NO(Figura 15), sugerindo uma relação direta do TLR4 e a nNOS (Figura 13).

Os receptores TLR2 também antagonizados pela AM, porém de forma mais fraca, não alteram a captação de LDLox (Figura 18), confirmando que o TLR4 é o receptor do tipo TOLL envolvido na captação de LDLox e por conseguinte na formação de células espumosas como evidenciado por Chavez-Sanchez et. al, (CHÁVEZ-SÁNCHEZ et al., 2014).

Nós evidenciamos também que a captação de LDLox pelo TLR4 é mediada pela fosforilação da ERK1/2 (Figura 19) como indicado pelo Choi et. al, (CHOI et al., 2009) para a LDL minimamente oxidada (mmLDL), dado que a ativação da ERK1/2 foi abolida em macrófagos *knocktout* para o receptor TLR4 e pré-incubados com AM e que a inibição da ERK1/2 reduziu a captação de LDLox. A inibição da quinase JNK, reduziu em um menor grau a captação, mas os níveis de fosforilação não foram alterados pela ausência do TLR4 o pre-incubação com AM. Estes resultados indicam que o TLR4 poderia estar induzindo a via da Ras/Raf/Mek/Erk que leva a reorganização do citoesqueleto e assim induzir entrada de moléculas de LDL via macropinocitose (CHOI et al., 2009) e também indica que a atividade da JNK é mediada por outro receptor, provavelmente o receptor PAF, dado o efeito da inibição desse receptor na captação e segundo comprovado por Rios et al para macrófagos humanos expostos a LDLox por tempo maior (RIOS; GIDLUND; JANCAR, 2011)(RIOS et al., 2012) .

As medidas de captação de LDLox usando Polimixina B (um neutralizante e inibidor dos efeitos do LPS), tanto nas preparações de LDLox quanto nas células, corrobora que os resultados foram derivados pela ativação do receptor TLR4 mediada de forma única pela LDLox e não por contaminação do LPS no material ou nas preparações (dados nao mostrados) .

A inibição da nNOS e o NO exógeno não alteraram a captação de LDLox em macrófagos pré-tratados com Latrunculina A (Figura 20). Este inibidor da polimerização de actina, reduziu a captação adicionando evidencia a hipótese de que a a LDLox estaria sendo internalizada por macropinocitose, e de forma interessante que a regulação pelo NO e nNOS ocorre por um mecanismo que interfere no processo de macropinocitose. Este resultado também confirma que a regulação da captação de LDLox pelo NO não é mediado pela reversão ou prevenção de maior oxidação das moléculas de LDL, como sugerido por Sainani 2003 (Gurmukh S. Sainani, 2003) .

O espalhamento ou *spreading* e polimerização de actina pode ser induzida pela mmLDL (MILLER et al., 2003). Neste trabalho observou-se maior polimerização de actina e re-arranjos nas membranas em resposta à LDLox. Nós confirmamos que o mecanismo de regulação de NO interfere no processo de macropinocitose, pois a inibição da nNOS levou a

uma maior polimerização e reorganização dos filamentos de actina e de forma contraria, o doador de NO preveniu estas alterações (Figura 21). Resultados similares foram obtidos por Chang-Duk Jun et al, (JUN et al., 1996) estimulando macrófagos com INF e LPS. Contudo existem trabalhos mostrando que alterações no reparo de membrana de células endoteliais induzido por patógenos pode levar a mobilização de cálcio e ocasionar uma endocitose compensatória (**??**) . Este poderia ser um outro mecanismo induzido pelo TLR4 após reconhecimento de LDLox. A regulação do NO em macrófagos estimulados com LDLox, foi dependente do TLR4 (Figura 21). Embora, não observado um maior espalhamento ou formação de macropinosomos, níveis basais altos de actina nos macrófagos *knocktout* para TLR4 foi evidenciado. Contudo, estes macrófagos não tem capacidade de captar moléculas de LDLox. Por tanto, o alto conteúdo de actina nestas células, poderia explicar-se por uma menor depolimerização ou reciclagem de actina, que poderia ocorrer por uma menor ribosilação do ADP, mediada pelo NO (JUN et al., 1996) , (LIU; SUNDQVIST, 1997), (KE et al., 2001) . Estes resultados sugerem que estas células teriam uma menor biodisponibilidade de NO e em consequência que o TLR4 poderia ativar a nNOS.

Para avaliar a ativação da nNOS pelo TLR4, primeiro nós encontramos que os níveis de NO estão diminuídos pela inativação do superoxido que também está sendo produzido. Alguns trabalhos demostram ativação da NAPH oxidase pelo TLR4 (BAE et al., 2009) e aqui confirmamos que a LDLox induz sua atividade a partir 30 minutos de exposição (Figura 7). Esses níveis de NO e Superoxido são reduzidos na presença de AM e em células *knockout* para o TLR4, e quando o superoxido é dismutado o NO produzido é inibido na presença da AM e do inibidor da nNOS. Estes resultados suportam a evidência que o TLR4 ativa a nNOS e por outro lado explicariam o alto conteúdo de actina dos macrófagos $TLR4^{-/-}$. Além disso sugerem que ao longo do tempo a ativação pelo TLR4 contribuiria no retardo da aparição do estresse oxidativo e que quando cronico, participaria no possível desacoplamento da nNOS gerando um estresse oxidativo maior.

Existe evidencia demostrando que a ativação da nNOS poderia estar mediada principalmente pela desfosforilação do resíduo Ser852 da nNOS , gerando maior produção de NO. Medidas de fosforilação demostram que o estimulo com LDLox diminui a fosforilação do resíduo Ser852. Este efeito na ativação da nNOS é dependente do TLR4 (Figura 23) corroborando a ativação da nNOS pelo TLR4. Huang et al., (HUANG et al., 2012a) mostrou que a nNOS pode ser ativada em macrófagos pela ERK1/2 e de maneira cálcio dependente. Aqui nós observamos ativação da ERK, mas esta não corresponde à ativação mediada pela desfosforilação. E por outro lado, em outros trabalhos temos demonstrado que a ERK1/2 leva à inativação da nNOS ao fosforilar este resíduo (CAMPOS-MOTA et al., 2017).

Com o fim de elucidar o mecanismo de ativação da nNOS, avaliamos a participação das quinases PI3K e a PKA, dado que alguns trabalhos mostram a ativação destas quinases

apos ativação do TLR4 (LAIRD et al., 2009), (ZHAO et al., 2014), (BROWN et al., 2011) e as duas podem levar a ativação da nNOS (HURT; SEZEN, 2012), (YEN et al., 2011) (CUNHA et al., 2010). Neste trabalho observou-se que a inibição da PI3K não alterou nem a produção de NO nem a captação de LDLox. Por outro lado a PKA participa, tanto na produção de NO, quanto na captação de LDLox (Figura 24), o que indica que a PKA pode estar envolvida pa via de sinalização que ativa a nNOS.

Avaliamos o influxo de cálcio e a mobilização de cálcio reticular como via de ativação da Adenilato ciclase solúvel (sAC) como possível fonte de cAMP para ativar a PKA, dado que o TLR4 não é um receptor acoplado a proteína G. Contudo, sabe-se que o TLR4 funciona junto com o co-receptor, o CD14, que ativa a plc (ZANONI et al., 2011) (MILLER et al., 2003) . Nós observamos que a inibição da PLC previne a mobilização do cálcio do retículo e o influxo de cálcio (Figura 25), que parece ser estimulado pela PKA, dado que a inibição desta abole o influxo de cálcio e ainda aumenta o armazenamento de cálcio no retículo. Os efeitos de mobilização de cálcio no retículo e influxo de cálcio se mostraram dependentes do TLR4 (Figura 25), indicando que o TLR4 poderia estar contribuindo na ativação da nNOS pela disponibilização de cálcio pois a nNOS é dependente de cálcio.

A PKA pode fosforilar o resíduo Ser1417 para ativar a nNOS (OSUKA et al., 2013). Porém o resíduo Ser1417 não está fosforilado o suficiente em resposta à LDLox. Pelo contrário, a inibição da PKA leva a um aumento da fosforilação do resíduo Ser852, sugerindo um envolvimento de ativação de fosfatases na via *downstream* da PKA. Trabalhos sugerem ativação da fosfatase PP1 pela PKA (LIU et al., 2004) e participação das fosfatase PP1, PP2a e calineurina na ativação da nNOS em células neurais (RAMEAU; CHIU; ZIFF, 2003), (RAMEAU et al., 2007) . Nós demostramos aqui que a inibição da PP1 preveniu a desfosforilação da nNOS- Ser852 (Figura 26) e que a PKA induziu translocação dessa fosfatase para o citoplasma em resposta à LDLox em macrófagos (Figura 27). Neste trabalho propomos então uma via de sinalização induzida pelo TLR4 dependente da PKA e PP1 como mostrado na Figura 37.

Como descrito por outros autores (HUTCHINSON et al., 2010) , nós confirmamos que a AM pode reduzir de forma eficiente a sinalização do TLR4, neste caso, mediada pela LDLox. Por conseguinte, o uso da AM teria um potencial clinico para a prevenção das respostas na aterosclerose induzidas pelo TLR4, como a formação de células espumosas e liberação de citocinas. Para isso mais pesquisas sobre o efeito da AM em modelos de aterosclerose *in vivo*, se fazem necessários.

Depois de demonstrada a relação do TLR4 com a nNOS, investigamos se poderia haver uma interação física-molecular entre elas, como evidenciado por Park (PARK et al., 2004) para o TLR4 e a NADPH oxidase 4. Ao avaliar a co-localização das 2 proteínas encontramos uma correlação de base tanto em placas ateroscleróticas nas paredes da carótida ou em macrófagos isolados. Esta correlação não mudou na placa mas sim após o estimulo com

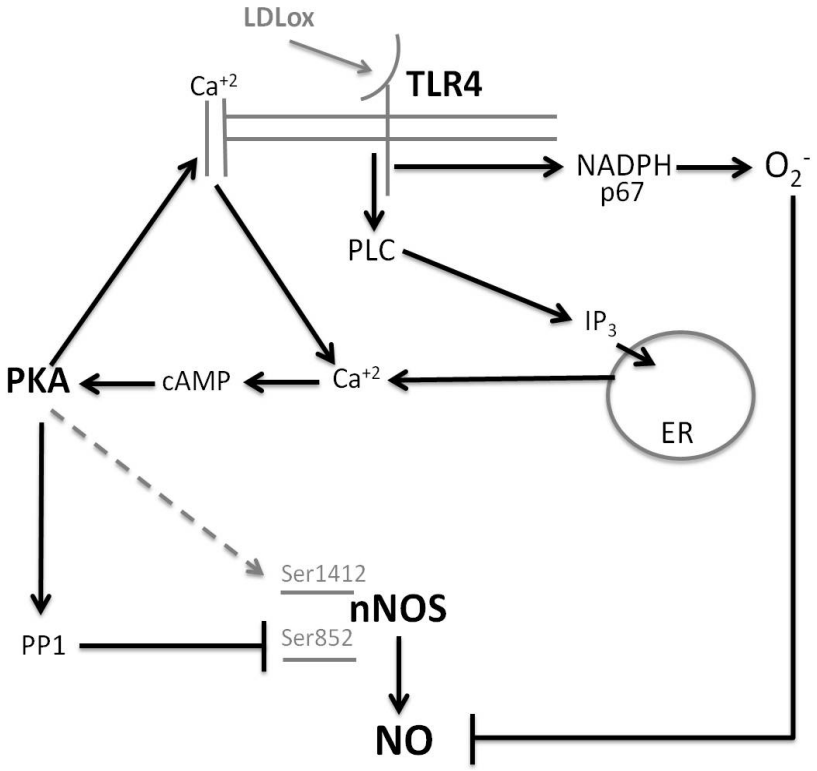


Figura 37 – Via de ativação da nNOS pelo TLR4

Mecanismo proposto para a ativação da nNOS induzido pelo TLR4 após reconhecimento da LDLox em macrófagos.

LDLox nos macrófagos, o que poderia representar uma maior concentração das duas macacões representando o endosomo que pode se formar resultante da internalização do TLR4 (ZANONI et al., 2011) ou sobrexposição por mudança na localização das duas proteínas. Contudo, por se tratarem de imagens capturadas por microscopia de epifluorescência e não confocal, a inferência é menos confiável e pode indicar simplesmente superpossição das duas marcações. A imunoprecipitação do TLR4 com a nNOS confirmou a interação basal, mas mostra uma diminuição da interação após estimulo com LDLox, que sugeriria um aumento da atividade pelo desligamento da enzima do receptor, como acontece com a eNOS e a Caveola (SÁNCHEZ et al., 2006) (SÁNCHEZ et al., 2008). Contudo, esses resultados precisariam de outras aproximações na colocalização para ter uma ideia mas clara da interação do TLR4 com a nNOS.

Alguns autores demostraram interação do TLR4 com o TLR2 e CD36 (STEWART et al., 2010) (TRIANTAFILOU et al., 2006). Neste trabalho não foi confirmada a interação do TLR4 com o CD36 para o reconhecimento e sinalização induzida pela LDLox por 1 hora. Talvez o tempo para a formação deste complexo molecular é maior ao utilizado neste modelo e outras interações poderiam estar acontecendo antes de induzir recrutamento o expressão do CD36 (RIOS; GIDLUND; JANCAR, 2011). Este resultado confirmaria que

nesta primeira hora de captação a participação do TLR4 prevalece sobre a do CD36.

Assim, nos mostramos um mecanismo regulatório do TLR4 em macrófagos como uma maneira de controlar acumulo excessivo de lípidos que converte-se em obsoleto quando o estresse oxidativo sobrepassa a barreira fisiológica.

5.2 Mecanismo de ativação da nNOS no endotélio

O sistema de ativação endotelial é um reconhecido modelo de uma resposta à vários agonistas para produção de NO e consequentes impactos na função vascular, como a resposta vasodilatadora. Em consequência, é um bom modelo para o estudo da ativação não só da isoforma endotelial da NOS, mas também da nNOS dada sua participação e importância no sistema vascular já descrita (CAPETTINI; CORTES; LEMOS, 2010) (CAPETTINI et al., 2008) (KUHLENCORDT et al., 2006) .

Nós visamos validar o mecanismo de ativação da nNOS encontrado no macrófago, no endotélio vascular. Neste sistema, encontramos que a nNOS é ativada por um mecanismo similar dependente da PKA e subsequente ativação da PP1. Especificamente propomos um mecanismo envolvendo dissociação do NIPP1/PP1 e translocação do PP1 dependente da PKA. A ativação da PP1 induz desfosforilação do resíduo ser852 da nNOS e subsequente produção de NO e H_2O_2 levando à vasodilatação dependente do endotélio .

A disfunção endotelial é um importante fator precedente de doenças cardiovasculares incluindo a aterosclerose (CERVENKA et al., 2001), (MORISHITA et al., 2002) (VANHOUTTE, 1997) . Está comummente relacionada ao desacoplamento da eNOS e consequente redução da biodisponibilidade de NO. Apesar da importância da eNOS, a nNOS além de participar na resposta fisiológica do endotélio, também esta comprometida em condições de dislipidemia (WILCOX et al., 1997), (TSUTSUI, 2004), (CAPETTINI et al., 2011) . Nós confirmamos aqui, que a ativação da nNOS é importante no relaxamento vascular induzido pela Acetilcolina (Ach), devido a produção de NO e H_2O_2 (figura 31). Alguns trabalhos do grupo de Shimokawa (GODO; SHIMOKAWA, 2017) sugerem um papel principal para eNOS em vasos de grande calibre. Contudo, o possível desacoplamento ou compensação regulatória das outras isoformas não foi descartado. Este limitante é prevenido com o silenciamento agudo da eNOS neste modelo. Dado que a inibição farmacológica da nNOS inibiu completamente a resposta da vasodilatadora e a produção de NO e H_2O_2 em animais onde a eNOS foi silenciada de forma aguda, nos podemos confirmar a participação da nNOS na liberação de fatores vasorelaxantes e a importância desta na manutenção da função vascular.

Neste modelo investigamos os mecanismos envolvidos na ativação da nNOS, os quais são poucos conhecidos quando comparados com a eNOS. No endotélio a eNOS pode ser ativada em resposta a estresse de cisalhamento e diversos agonistas levando à níveis elevados de cálcio intracelular, interações com substratos, co-fatores e proteínas regulatória e por ultimo fosforilação (FORSTERMANN; SESSA, 2012) , (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001) . A eNOS pode ser fosforilada em vários resíduos como a tyrosina (Y81, Y567), serina (S114, S615, S633, S1177) e treonina (T495) por varias quinases que incluem a Proteína quinase B/AKT, PKA, AMPK, CAMKII e PKC para ativar ou inativar a enzima (FLEMING et al., 2001) , (DIMMELER et al., 1999) , (FLEMING, 2010) . O controle dessa fosforilação esta mediado pelas proteínas fosfatase PP2A, PP1 e calcineurina (PP2B) (MICHELL et al., 2001) , embora a contribuição individual de cada fosfatase e o sitio de desfosforilação especifico permanecem pouco elucidados.

Trabalhos estudando mecanismos envolvidos na ativação da nNOS geralmente baseiam-se em dados para a eNOS. Contudo, existem algumas diferenças entre a ativação das duas isoformas. O resíduo Ser852 da nNOS localizado no sitio inibitório da enzima, quando fosforilado, reduz a ligação do complexo cálcio/calmodulina com a nNOS diminuindo assim a atividade desta (BREDT; FERRIS; SNYDER, 1992). De forma contraria, desfosforilação desse resíduo facilita a interação do complexo cálcio/calmodulina induzindo ativação inclusive à baixas concentrações de cálcio citosolico (KOMEIMA et al., 2000) , (SONG et al., 2004) . Aqui, nos evidenciamos que a ativação da nNOS em anéis de aorta e em células endoteliais com Ach é mediado pela desfosforilação do resíduo Ser852 (Figura32), corroborando resultados antes descritos por nosso grupo indicando que o comprometimento da atividade da nNOS e menor produção de NO em resposta a LDLox e LPC no endotélio acontece pela fosforilação desse resíduo (CAMPOS-MOTA et al., 2017) ,(NAVIA-PELAEZ et al., 2017) .

Estudos anteriores tem mostrado que a ciclosporina A e o ácido Okadaico bloqueiam a desfosforilação da nNOS em células do cérebro, mediado pela Calcineurina via receptor NMDA (RAMEAU; CHIU; ZIFF, 2003), embora a ativação de outras fosfatases possa estar envolvida no processo . A PP2A usualmente reduz a atividade da eNOS desfosforilando-a no resíduo Ser1177, porem também desfosforila o resíduo Ser116 levando à um aumento de NO (ZHAN et al., 2012), (PARK et al., 2015) . Nossos resultados sugerem que a PP2 não participa no processo de ativação da nNOS (Figura 33), dado que sua inibição não alterou nem os nives de fosforilação nem a resposta vasodilatadora à Ach nos anéis de aorta nos quais a eNOS foi silenciada. Por outro lado a inibição da PP1 alterou a fosforilação do sitio ser852 e também bloqueou a resposta vasodilatadora nesses animas com a eNOS silenciada. Estes resultados confirmam a participação da PP1 na ativação da nNOS como visto no macrófago.

A ativação da PP1 é controlada por varias proteínas inibitórias que a mantem inativa no núcleo ou outras regiões perinucleares. A fosforilação desses inibidores leva à dissociarão

da PP1, e consequente translocação e ativação (JIN et al., 2003) . Aqui observou-se que o inibidor endógeno NIPP1 controla a atividade da PP1 em células endoteliais estimuladas com Ach induzindo dissociação do NIPP1/PP1 e translocação para o citoplasma (Figura 34). Alguns trabalhos sugerem desfosforilação desses inibidores endógenos da PP1 para a ativação da PP1 (BLITZER et al., 1998) . Nó s descartamos esta possibilidade dado, que a inibição de outras fosfatases não impediu a fotofosforilação da nNOS. Adicionalmente outros autores suportam a ideia de que os inibidores endógenos da PP1 devem ser fosforilados para ativar a PP1. Assim o NIPP1 precisa ser fosforilado para que a dissociação do complexo NIPP1/PP1 aconteça. Há evidencia mostrando que a PKA ativa a PP2A no cérebro (AHN et al., 2007) e que fosforila o GBPI (outra proteína inibidora da PP1) reduzindo sua potencia inibitória (LIU et al., 2004) . Nossos dados mostram que a desfosforilação da nNOS pela PP1 é dependente da PKA (Figura 35). Bredt et al, sugeriu inibição da nNOS pela PKA (BREDT; FERRIS; SNYDER, 1992) . Contudo, nós observamos que a inibição da PKA impediu a translocação da PP1, e a desfosforilação do resíduo ser852 da nNOS como visto no macrófago. Adicionalmente o uso do análogo do AMPc, o 8-Br-cAMP, estimulou a desfosforilação da nNOS e induziu a dissociação do complexo NIPP1/PP1 induzindo a sua atividade. Estes resultados indicam que a PKA é responsável pela fosforilação do NIPP1 em células endoteliais, adicionando maior informação ao mecanismo de ativação da nNOS.

Nós observamos translocação da nNOS para a região perinuclear após estimulo com Ach, que também foi dependente da PKA (Figura 36). Da mesma forma, em macrófagos a ativação da nNOS pela LDLox também induz translocação da nNOS para a região perinuclear (dados não mostrados). Acreditamos que a PKA ou proteínas ancoradoras - da PKA (APKAs) poderiam estar orquestrando as ações da PP1 sobre a nNOS, compartimentalizando ou carregando a PP1 e a nNOS na região perinuclear, como observado para outros efeitos cardioprotetores mediados pela PKA (EDWARDS; SCOTT; BAILLIE, 2012) . Porém, mais experimentos são necessários para comprovar este mecanismo.

Finalmente provemos nova evidencia de uma ativação coordenada da PKA e PP1 e subsequente desfosforilação da nNOS-Ser852 em dois modelos celulares em condições fisiologias e patológicas. Adicionalmente elucidamos melhor o mecanismo de ativação da PP1 pela fosforilação do NIPP1 em células endoteliais (Figura 38) ((NAVIA-PELAEZ et al., 2018) - ver anexo) . Mais estudos em relação a fosforilação do resíduo 1417 ajudariam para elucidar completamente os mecanismos de regulação da atividade da nNOS.

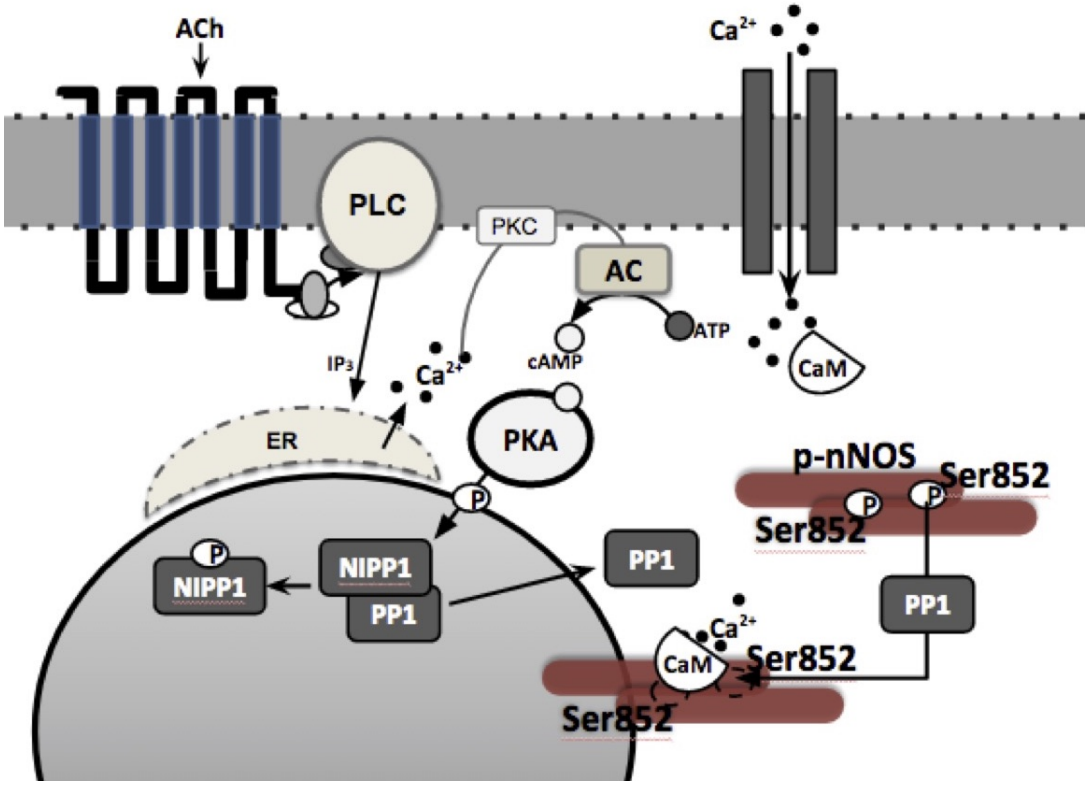


Figura 38 – Via de ativação da nNOS no endotélio

Mecanismo proposto para a ativação da nNOS induzido pela Acetilcolina em células endoteliais.

Considerações Finais

Neste trabalho foi elucidado um mecanismo de ativação da nNOS similar em macrófagos e células endoteliais, sob diferentes condições, permitindo entender melhor a participação desta isoforma da NOS na biologia Vascular.

O mecanismo de ativação descrito da nNOS é dependente da dissociação da PP1 do NIPP1 induzida pela PKA. A ativação da PP1 leva à desfosforilação do resíduo Ser852 da nNOS e subsequente produção de NO e H2O2 importantes no relaxamento vascular e na regulação da captação de LDLox.

A ativação da nNOS em macrófagos em resposta à LDLox é mediado pelo TLR4 como um mecanismo regulatório para controlar o acumulo de lipídios, que provavelmente se torna obsoleto com o aumento na exposição a LDLox e subsequente estresse oxidativo.

Dado que a nNOS tem um importante participação na fisiopatologia da aterosclerose, o entendimento dos mecanismos que regulam sua atividade se faz importante para considerá-lá, junto com o TLR4 como alvos terapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares associadas com a progressão da placa.

Neste sentido mais experimentos em vivo são necessários, considerando o possível uso de AM como modulador do TLR4 e da nNOS no tratamento da aterosclerose, sendo uma boa opção para o reposicionamento do fármaco.

Referências

AGRAWAL, V. et al. Platelet-activating factor: a role in preterm delivery and an essential interaction with Toll-like receptor signaling in mice. *Biology of reproduction*, v. 91, n. 5, p. 119, nov 2014. ISSN 1529-7268. Disponível em: <http://www.biolreprod.org/content/91/5/119.abstract>. Citado na página 72.

AHMED, A. et al. Angiopoietin-2 confers atheroprotection in apoE-/- mice by inhibiting LDL oxidation via nitric oxide. *Circulation Research*, v. 104, n. 12, p. 1333–1336, 2009. ISSN 00097330. Citado na página 21.

AHN, J.-H. et al. Protein kinase A activates protein phosphatase 2A by phosphorylation of the B56delta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 8, p. 2979–2984, 2007. ISSN 0027-8424. Citado na página 79.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, v. 357, n. Pt 3, p. 593–615, 2001. ISSN 0264-6021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463332>. Citado na página 78.

AMEZIANE, N. et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 23, n. 12, p. e61–e64, 2003. ISSN 1524-4636. Citado na página 19.

ASLANIAN, A. M.; CHARO, I. F. Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis. *Circulation*, v. 114, n. 6, p. 583–590, 2006. ISSN 00097322. Citado na página 20.

BÄCK, M.; HANSSON, G. K. Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Nature reviews. Cardiology*, v. 12, n. 4, p. 199–211, 2015. ISSN 1759-5010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25666404>. Citado na página 18.

BAE, Y. S. et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: Toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circulation Research*, v. 104, n. 2, p. 210–218, 2009. ISSN 00097330. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 74.

BARQUERA, S. et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Archives of Medical Research*, v. 46, n. 5, p. 328–338, 2015. ISSN 01884409. Citado na página 15.

BERTON, G.; MÓCSAI, A.; LOWELL, C. A. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends in immunology*, Elsevier, v. 26, n. 4, p. 208–14, apr 2005. ISSN 1471-4906. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1471490605000268/fulltext>. Citado na página 23.

BINDER, C. J.; PAPAC-MILICEVIC, N.; WITZTUM, J. L. Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, v. 16, n. 8, p. 485–497, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.

BLITZER, R. D. et al. Gating of CaMKll by CAMP-Regulated Protein Phosphatase Activity During LTP. *Science*, v. 280, p. 17–20, 1998. Citado na página 79.

BOMFIM, G. F. et al. Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clinical science (London, England : 1979)*, v. 122, n. 11, p. 535–43, 2012. ISSN 1470-8736. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4004345{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 22.

BOULLIER, A. et al. Phosphocholine as a pattern recognition ligand for CD36. *Journal of lipid research*, v. 46, n. 5, p. 969–76, 2005. ISSN 0022-2275. Disponível em: <http://www.jlr.org/content/46/5/969.full>. Citado na página 20.

BOYANOVSKY, B. B.; Van Der Westhuyzen, D. R.; WEBB, N. R. Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 38, p. 32746–32752, 2005. ISSN 00219258. Citado na página 20.

BREDT, D. S.; FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *The Journal of biological chemistry*, v. 267, n. 16, p. 10976–10981, 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed{&}id=1375933{&}retmode=ref{&}cmd=prlinks$\delimiter"026E30F$npapers2://publication/uuid/C13B8676-F5AC-40A6-897D-0DE>. Citado 2 vezes nas páginas 78 e 79.

BROWN, J. et al. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of dental research*, v. 90, n. 4, p. 417–27, apr 2011. ISSN 1544-0591. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3075579{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 75.

CALVANO, J. et al. (CD14 , TLR4 , MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. *Blood*, v. 20, n. 5, p. 415–419, 2003. ISSN 1073-2322. Citado na página 22.

CAMPOS-MOTA, G. P. et al. Role of ERK1/2 activation and nNOS uncoupling on endothelial dysfunction induced by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, v. 258, p. 108–118, 2017. ISSN 18791484. Citado 2 vezes nas páginas 74 e 78.

CAPETTINI, L. S. a. et al. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, v. 295, n. 6, p. H2503–11, 2008. ISSN 0363-6135. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952716>. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 77.

CAPETTINI, L. S. A.; CORTES, S. F.; LEMOS, V. S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *European Journal of Pharmacology*, v. 643, n. 2-3, p. 260–266, 2010. ISSN 00142999. Citado na página 77.

CAPETTINI, L. S. A. et al. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in atherosclerosis. *British Journal of*

Pharmacology, v. 164, n. 6, p. 1738–1748, 2011. ISSN 00071188. Citado 4 vezes nas páginas 15, 18, 70 e 77.

CASÓS, K. et al. Atherosclerosis prevention by a fish oil-rich diet in apoE-/- mice is associated with a reduction of endothelial adhesion molecules. *Atherosclerosis*, v. 201, n. 2, p. 306–317, 2008. ISSN 00219150. Citado na página 17.

CASTRILLO, A. et al. Crosstalk between LXR and Toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Molecular Cell*, v. 12, n. 4, p. 805–816, 2003. ISSN 10972765. Citado 3 vezes nas páginas 17, 19 e 20.

CERVENKA, L. et al. Role of nNOS in regulation of renal function in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, v. 38, n. 2, p. 280–5, 2001. ISSN 1524-4563. Citado na página 77.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, v. 410, n. 6824, p. 37–40, 2001. ISSN 0028-0836. Citado na página 23.

CHANG, M.-K. et al. Apoptotic cells with oxidation-specific epitopes are immunogenic and proinflammatory. *The Journal of experimental medicine*, v. 200, n. 11, p. 1359–1370, 2004. ISSN 0022-1007. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 19.

CHÁVEZ-SÁNCHEZ, L. et al. The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans. *Human immunology*, v. 75, n. 4, p. 322–9, apr 2014. ISSN 1879-1166. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486576>. Citado 3 vezes nas páginas 15, 21 e 73.

CHIANG, C. Y. et al. Phospholipase C-2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 6, p. 3704–3709, 2012. ISSN 00219258. Citado na página 23.

CHOI, H. S. et al. Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 166, n. 2, p. 178–186, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{_}u>. Citado na página 18.

CHOI, S. H. et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circulation Research*, v. 104, n. 12, p. 1355–1363, 2009. ISSN 00097330. Citado 4 vezes nas páginas 19, 21, 23 e 73.

CHOI, S. H. et al. Polyoxygenated cholesterol ester hydroperoxide activates TLR4 and SYK dependent signaling in macrophages. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, 2013. ISSN 19326203. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 21.

COLE, J. E.; MITRA, A. T.; MONACO, C. Treating atherosclerosis: the potential of Toll-like receptors as therapeutic targets. *Expert review of cardiovascular therapy*, v. 8, n. 11, p. 1619–35, 2010. ISSN 1744-8344. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21090937>. Citado 3 vezes nas páginas 18, 19 e 24.

COMINACINI, L. et al. The Binding of Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL Receptor-1 Reduces the Intracellular Concentration of Nitric Oxide in Endothelial Cells through an Increased Production of Superoxide. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 17, p. 13750–13755, 2001. ISSN 00219258. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 17.

CONNELLY, L. et al. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. ISSN 00219258. Citado na página 71.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 9, p. 4442–4447, 2010. ISSN 0027-8424. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 75.

CURTISS, L. K.; TOBIAS, P. S. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of lipid research*, v. 50 Suppl, p. S340–5, 2009. ISSN 0022-2275. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674724{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 18.

CUSSON-HERMANCE, N. et al. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF-{kappa}B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *The Journal of biological chemistry*, v. 280, n. 44, p. 36560–6, 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115877>. Citado na página 23.

Di Pietro, N.; FORMOSO, G.; PANDOLFI, A. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*, v. 84, p. 1–7, 2016. ISSN 18793649. Citado na página 72.

DIMMELER, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, v. 399, n. June, p. 601–605, 1999. ISSN 0028-0836. Citado na página 78.

DURYEE, M. J. et al. Scavenger receptors on sinusoidal liver endothelial cells are involved in the uptake of aldehyde-modified proteins. *Molecular Pharmacology*, v. 68, n. 5, p. 1423–1430, 2005. ISSN 0026-895X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16105988>. Citado na página 20.

EDWARDS, H.; SCOTT, J.; BAILLIE, G. The A-kinase-anchoring protein AKAP-Lbc facilitates cardioprotective PKA phosphorylation of Hsp20 on Ser ¹⁶. *Biochemical Journal*, v. 446, n. 3, p. 437–443, 2012. ISSN 0264-6021. Disponível em: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20120570>. Citado na página 79.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. 1991. 81–128 p. Citado na página 20.

FALCK-HANSEN, M.; KASSITERIDI, C.; MONACO, C. *Toll-like receptors in atherosclerosis*. 2013. 14008–14023 p. Citado na página 19.

FANG, H. et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) is essential for Hsp70-like protein 1 (HSP70L1) to activate dendritic cells and induce Th1 response. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 35, p. 30393–30400, 2011. ISSN 00219258. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 24.

FITZGERALD, K. a. et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature immunology*, v. 4, n. 5, p. 491–6, 2003. ISSN 1529-2908. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692549>. Citado na página 23.

FLEMING, I. *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. 2010. 793–806 p. Citado na página 78.

FLEMING, I. et al. Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. 2001. Citado na página 78.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, v. 33, n. 7, p. 829–837, apr 2012. ISSN 0195-668X. Disponível em: <http://eurheartj.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/eurheartj/ehr304>. Citado na página 78.

FREMONT, L.; BELGUENDOUZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sciences*, v. 64, n. 26, p. 2511–2521, 1999. ISSN 00243205. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.

GAO, S.; GENG, Y. J. *LOX-1: A male hormone-regulated scavenger receptor for atherosclerosis*. 2013. 138–143 p. Citado na página 21.

GINGERICH, S.; KRUKOFF, T. L. Activation of ER?? increases levels of phosphorylated nNOS and NO production through a Src/PI3K/Akt-dependent pathway in hypothalamic neurons. *Neuropharmacology*, v. 55, n. 5, p. 878–885, 2008. ISSN 00283908. Citado na página 25.

GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier B.V., v. 109, n. October 2016, p. 4–10, 2017. ISSN 18734596. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.019>. Citado na página 77.

GREENBERG, M. E. et al. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 203, n. 12, p. 2613–2625, 2006. ISSN 0022-1007. Citado na página 20.

GUHA, M.; MACKMAN, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 35, p. 32124–32132, 2002. ISSN 00219258. Citado na página 24.

Gurmukh S. Sainani, M. S. B. R. S. Endothelial Cell Dysfunction—a Key Factor in Atherogenesis and Its Reversal (Laboratory and Clinical Study). n. 91, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 71 e 73.

HAROKOPAKIS, E.; HAJISHENGALLIS, G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, tool-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *European Journal of Immunology*, v. 35, n. 4, p. 1201–1210, 2005. ISSN 00142980. Citado na página 24.

HAYASHI, Y. et al. Regulation of Neuronal Nitric-oxide Synthase by Calmodulin Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 29, p. 20597–20602, jul 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/content/long/274/29/20597>. Citado na página 24.

HEGYI, L. et al. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *The Journal of pathology*, v. 180, n. 4, p. 423–429, 1996. ISSN 0022-3417. Citado na página 17.

HEISTAD, D. D. *Oxidative stress and vascular disease*. 2006. 689–695 p. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18.

HIGASHI, Y. et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*, v. 73, n. March, p. 411–418, 2009. ISSN 1346-9843. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{_}u>. Citado na página 17.

HIGASHIMORI, M. et al. Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 31, n. 1, p. 50–57, 2011. ISSN 10795642. Citado na página 19.

HUANG, H. et al. Induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by oxLDL inhibits macrophage derived foam cell migration. *Atherosclerosis*, v. 235, n. 1, p. 213–222, 2014. ISSN 18791484. Citado na página 70.

HUANG, Z. et al. Stimulation of unprimed macrophages with immune complexes triggers a low output of nitric oxide by calcium-dependent neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 7, p. 4492–4502, 2012. ISSN 00219258. Citado 4 vezes nas páginas 18, 22, 25 e 74.

HUANG, Z. et al. Stimulation of unprimed macrophages with immune complexes triggers a low output of nitric oxide by calcium-dependent neuronal nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 7, p. 4492–4502, 2012. ISSN 00219258. Citado na página 71.

HUANG, Z. et al. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science*, v. 265, n. 5180, p. 1883–5., 1994. ISSN 00368075. Citado na página 15.

HURT, K.; SEZEN, S. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 41, p. 16624–16629, 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/109/41/16624.short>. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 75.

HUTCHINSON, M. R. et al. Evidence that tricyclic small molecules may possess toll-like receptor and myeloid differentiation protein 2 activity. *Neuroscience*, v. 168, n. 2, p. 551–563, 2010. ISSN 03064522. Citado na página 75.

ICHIKI, T. et al. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension*, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 342–8, 1998. ISSN 0194-911X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453326>. Citado na página 22.

IMAI, Y. et al. Identification of Oxidative Stress and Toll-like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell*, v. 133, n. 2, p. 235–249, 2008. ISSN 00928674. Citado na página 21.

ISENBERG, J. S. et al. Thrombospondin-1 inhibits nitric oxide signaling via CD36 by inhibiting myristic acid uptake. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 21, p. 15404–15415, 2007. ISSN 00219258. Citado 3 vezes nas páginas 15, 21 e 71.

JACOBS, a. T.; IGNARRO, L. J. *Lipopolysaccharide-induced expression of interferon-beta mediates the timing of inducible nitric-oxide synthase induction in RAW 264.7 macrophages*. [s.n.], 2001. v. 276. 47950–7 p. ISSN 0021-9258. ISBN 3108257137. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11602590>. Citado na página 24.

JANG, H.-J. et al. Toll-like receptor 2 mediates high-fat diet-induced impairment of vasodilator actions of insulin. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, v. 304, n. 10, p. E1077–E1088, 2013. ISSN 0193-1849. Disponível em: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00578.2012>. Citado na página 21.

JEONG, S. J. et al. *Prdx1 (peroxiredoxin 1) deficiency reduces cholesterol efflux via impaired macrophage lipophagic flux*. 2017. 1–14 p. Citado na página 70.

JESSUP, W.; KRITHARIDES, L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Current opinion in lipidology*, v. 11, n. 5, p. 473–81, 2000. ISSN 0957-9672. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11048890>. Citado na página 20.

JIN, J. et al. Coactivation of TLR4 and TLR2/6 coordinates an additive augmentation on IL-6 gene transcription via p38MAPK pathway in U937 mononuclear cells. *Molecular Immunology*, v. 49, n. 3, p. 423–432, 2011. ISSN 01615890. Citado na página 21.

JIN, Q. et al. The protein phosphatase-1 (PP1) regulator, nuclear inhibitor of PP1 (NIPP1), interacts with the polycomb group protein, embryonic ectoderm development (EED), and functions as a transcriptional repressor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 33, p. 30677–30685, 2003. ISSN 00219258. Citado na página 79.

JUN, C. D. et al. Nitric oxide induces ADP-ribosylation of actin in murine macrophages: Association with the inhibition of pseudopodia formation, phagocytic activity, and adherence on a laminin substratum. *Cellular Immunology*, v. 174, n. 1, p. 25–34, 1996. ISSN 00088749. Citado na página 74.

KAWAI, T. et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, v. 11, n. 1, p. 115–122, 1999. ISSN 10747613. Citado na página 23.

KE, X. C. et al. Nitric oxide regulates actin reorganization through cGMP and Ca2+/calmodulin in RAW 264.7 cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1539, n. 1-2, p. 101–113, 2001. ISSN 01674889. Citado na página 74.

KHALIL, M. F.; WAGNER, W. D.; GOLDBERG, I. J. *Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis*. 2004. 2211–2218 p. Citado na página 17.

KIECHL, S. et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *The New England journal of medicine*, v. 347, n. 3, p. 185–192, 2002. ISSN 0028-4793. Citado na página 19.

KIM, F. et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circulation Research*, v. 100, n. 11, p. 1589–1596, 2007. ISSN 00097330. Citado na página 24.

KIM, Y. W. et al. Receptor-mediated mechanism controlling tissue levels of bioactive lipid oxidation products. *Circulation Research*, v. 117, n. 4, p. 321–332, 2015. ISSN 15244571. Citado na página 20.

KOMATSU, T. et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nitric oxide synthase mediate intrathecal morphine-induced nociceptive behavior. *Neuropharmacology*, v. 52, n. 5, p. 1237–1243, 2007. ISSN 00283908. Citado na página 25.

KOMEIMA, K. et al. Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/ calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells. *The Journal of biological chemistry*, v. 275, n. 36, p. 28139–43, 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874031>. Citado 3 vezes nas páginas 24, 25 e 78.

KONDO, T.; HIROSE, M.; KAGEYAMA, K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, v. 16, n. 5, p. 532–538, 2009. ISSN 1340-3478. Citado na página 17.

KUHLENCORDT, P. J. et al. Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 26, n. 7, p. 1539–1544, 2006. ISSN 1524-4636; 1079-5642. Disponível em: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/abstract/26/7/1539http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627802$\delimiter"026E30F$nhttp://atvb.ahajournals.org/content/26/7/1539.full.pdf>. Citado 3 vezes nas páginas 15, 18 e 77.

KUMANO-KURAMOCHI, M. et al. Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-histidine adducts that serve as ligands for human lectin-like oxidized LDL receptor-1. *The Biochemical journal*, v. 442, n. 1, p. 171–80, 2012. ISSN 1470-8728. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22077443>. Citado na página 20.

KUMANO-KURAMOCHI, M. et al. Lectin-like oxidized LDL receptor-1 is palmitoylated and internalizes ligands via caveolae/raft-dependent endocytosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 434, n. 3, p. 594–599, 2013. ISSN 10902104. Citado na página 20.

KUNJATHOOR, V. V. Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 51, p. 49982–49988, dec 2002. ISSN 00219258. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M209649200>. Citado na página 17.

KZHYSHKOWSKA, J.; NEYEN, C.; GORDON, S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology*, v. 217, n. 5, p. 492–502, 2012. ISSN 01712985. Citado na página 72.

LAIRD, M. H. W. et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. *Journal of leukocyte biology*, v. 85, n. 6, p. 966–77, 2009. ISSN 1938-3673. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289601$\delimiter"026E30F$nhttp:

//www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2698589>. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 75.

LECLERC, P. C. et al. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *British journal of pharmacology*, v. 148, n. 3, p. 306–13, 2006. ISSN 0007-1188. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1751562{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 22.

LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P. V. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxidants & redox signaling*, v. 13, n. 1, p. 39–75, 2010. ISSN 1523-0864. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 72.

LI, H. et al. Mechanistic studies of the long chain acyl-CoA synthetase Faa1p from Saccharomyces cerevisiae. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1771, n. 9, p. 1246–1253, 2007. ISSN 13881981. Citado na página 20.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 868–74, 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12490960>. Citado na página 17.

LIU, Q.-R. et al. GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA. *The Biochemical journal*, v. 377, n. Pt 1, p. 171–181, 2004. ISSN 02646021. Citado 2 vezes nas páginas 75 e 79.

LIU, S. M.; SUNDQVIST, T. Nitric oxide and cGMP regulate endothelial permeability and F-actin distribution in hydrogen peroxide-treated endothelial cells. *Experimental Cell Research*, v. 235, n. 1, p. 238–244, 1997. ISSN 00144827. Citado na página 74.

LLOYD, D. B.; BONNETTE, P.; THOMPSON, J. F. Protein fusions of BPI with CETP retain functions inherent to each. *Biochemistry*, v. 45, n. 43, p. 12954–12959, 2006. ISSN 00062960. Citado na página 21.

LOPES-VIRELLA, M. F.; VIRELLA, G. Pathogenic role of modified LDL antibodies and immune complexes in atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, v. 20, n. 10, p. 743–54, 2013. ISSN 1880-3873. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23965492>. Citado na página 18.

LOWENSTEIN, C. J. Beneficial effects of neuronal nitric oxide synthase in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 26, n. 7, p. 1417–1418, 2006. ISSN 10795642. Citado na página 18.

LU, Y.-C.; YEH, W.-C.; OHASHI, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, v. 42, n. 2, p. 145–51, 2008. ISSN 1096-0023. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043466608000070>. Citado na página 23.

LU, Z. et al. TLR4 antagonist reduces early-stage atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Endocrinology*, v. 216, n. 1, p. 61–71, 2013. ISSN 00220795. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 19.

LUCAS, K.; MAES, M. *Role of the toll like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: Possible treatments targeting the TLR4 pathway*. 2013. 190–204 p. Citado na página 19.

LUDMER, P. L. et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *The New England journal of medicine*, v. 315, n. 17, p. 1046–1051, 1986. ISSN 0028-4793. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3093861$\delimiter"026E30F$nhttp://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM198610233151702>. Citado na página 17.

MAIOLINO, G. et al. *The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: The myths and the facts*. 2013. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 17.

MANNING-TOBIN, J. J. et al. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 29, n. 1, p. 19–26, 2009. ISSN 10795642. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 71.

MAO, K. et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell research*, v. 23, n. 2, p. 201–12, 2013. ISSN 1748-7838. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3567828{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 24.

MARTIN, M. et al. Role of the Phosphatidylinositol 3 Kinase-Akt Pathway in the Regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, v. 171, n. 2, p. 717–725, 2014. ISSN 0022-1767. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/171/2/717.full>. Citado na página 24.

MATTILA, J. T.; THOMAS, A. C. Nitric oxide synthase: Non-canonical expression patterns. *Frontiers in Immunology*, v. 5, n. OCT, p. 1–5, 2014. ISSN 16643224. Citado na página 71.

MICHELL, B. J. et al. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. v. 276, p. 17625–17628., 2001. ISSN 00219258. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m{&}form=6{&}dopt=r{&}uid=11292821$\delimiter"026E30F$nhttp://www.jbc.org/cgi/content/full/276/21/17625$\delimiter"026E30F$nhttp://www.jbc.org/cgi/content/abstract/276>. Citado na página 78.

MICHELSEN, K. S. et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 29, p. 10679–10684, 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{_}uids=15249654$\delimiter"026E30F$nhttp://www.pnas.org/content/101/29/10>. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 19.

MIETUS-SNYDER, M.; GOWRI, M. S.; PITAS, R. E. Class A Scavenger Receptor Up-regulation in Smooth Muscle Cells by Oxidized Low Density Lipoprotein: ENHANCEMENT BY CALCIUM FLUX AND CONCURRENT CYCLOOXYGENASE-2 UP-REGULATION. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 23, p. 17661–17670, jun 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/275/23/17661.long>. Citado na página 15.

MILLER, Y. I. Toll-like receptors and atherosclerosis: oxidized LDL as an endogenous Toll-like receptor ligand. *Future Cardiol*, v. 1, n. 6, p. 785–792, 2005. ISSN 1744-8298. Citado na página 72.

MILLER, Y. I. et al. *Toll-Like Receptor-4 and Lipoprotein Accumulation in Macrophages*. 2009. 227–232 p. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 21.

MILLER, Y. I. et al. The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *British Journal of Pharmacology*, v. 167, n. 5, p. 990–999, nov 2012. ISSN 00071188. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2012.02097.x>. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 23.

MILLER, Y. I. et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 3, p. 1561–8, jan 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: <http://www.jbc.org/cgi/content/long/278/3/1561>. Citado 4 vezes nas páginas 21, 72, 73 e 75.

MÓCSAI, A.; RULAND, J.; TYBULEWICZ, V. L. J. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature reviews. Immunology*, v. 10, n. 6, p. 387–402, 2010. ISSN 1474-1733. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2765>. Citado na página 23.

MOORE, K. J.; FREEMAN, M. W. *Scavenger receptors in atherosclerosis: Beyond lipid uptake*. 2006. 1702–1711 p. Citado na página 21.

MOORE, K. J. et al. Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 8, p. 2192–2201, 2005. ISSN 00219738. Citado na página 20.

MORISHITA, T. et al. Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase. *Faseb J*, v. 16, n. 14, p. 1994–1996, 2002. Citado 3 vezes nas páginas 15, 18 e 77.

MUDAU, M. et al. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular journal of Africa*, v. 23, n. 4, p. 222–31, 2012. ISSN 1680-0745. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3721957{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 21.

MULLICK, A. E.; TOBIAS, P. S.; CURTISS, L. K. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *The Journal of clinical investigation*, v. 115, n. 11, p. 3149–56, 2005. ISSN 0021-9738. Citado na página 19.

NAITO, Y. et al. *Oxidative Stress Markers*. 2010. 36–44 p. Citado na página 17.

NAKANE, M. et al. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 180, n. 3, p. 1396–1402, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{_}>. Citado na página 25.

NAKATA, S. et al. Vascular neuronal NO synthase is selectively upregulated by platelet-derived growth factor: Involvement of the MEK/ERK pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 25, n. 12, p. 2502–2508, 2005. ISSN 10795642. Citado na página 25.

NAVIA-PELAEZ, J. M. et al. Modulation of nNOS ser852 phosphorylation and translocation by PKA/PP1 pathway in endothelial cells. *Nitric Oxide*, v. 72, p. 52–58, 2018. ISSN 10898603. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089860317301957>. Citado na página 79.

NAVIA-PELAEZ, J. M. et al. nNOS uncoupling by oxidized LDL: Implications in atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, Elsevier B.V., v. 113, n. April, p. 335–346, 2017. ISSN 18734596. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.018>. Citado 3 vezes nas páginas 70, 71 e 78.

OSUKA, K. et al. Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser1412 in the dentate gyrus of rat brain after transient forebrain ischemia. *Neurochemistry International*, v. 63, n. 4, p. 269–274, 2013. ISSN 01970186. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 75.

PANDA, K.; GHOSH, S.; STUEHR, D. J. Calmodulin Activates Intersubunit Electron Transfer in the Neuronal Nitric-oxide Synthase Dimer. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 26, p. 23349–23356, 2001. ISSN 00219258. Citado na página 24.

PARK, H. S. et al. Cutting Edge: Direct Interaction of TLR4 with NAD(P)H Oxidase 4 Isozyme Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Production of Reactive Oxygen Species and Activation of NF- B. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 6, p. 3589–3593, 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.173.6.3589>. Citado na página 75.

PARK, J. H. et al. B56δ subunit of protein phosphatase 2A decreases phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 116: Mechanism underlying aphidicolin-stimulated NO production. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 50, p. 46–51, 2015. ISSN 10898611. Citado na página 78.

PIMIENTA, G.; PASCUAL, J. *Canonical and alternative MAPK signaling*. 2007. 2628–2632 p. Citado na página 23.

PLOCIENNIKOWSKA, A. et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 72, n. 3, p. 557–581, 2015. ISSN 14209071. Citado na página 15.

POGUN, S.; BAUMANN, M. H.; KUHAR, M. J. Nitric oxide inhibits [3H]dopamine uptake. *Brain Research*, v. 641, n. 1, p. 83–91, 1994. ISSN 00068993. Citado na página 22.

RAMEAU, G. A.; CHIU, L. Y.; ZIFF, E. B. NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. In: *Neurobiology of Aging*. [S.l.: s.n.], 2003. v. 24, n. 8, p. 1123–1133. ISBN 0197-4580 (Print)\r0197-4580 (Linking). ISSN 01974580. Citado 3 vezes nas páginas 25, 75 e 78.

RAMEAU, G. a. et al. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 27, n. 13, p. 3445–3455, 2007. ISSN 1529-2401. Citado 3 vezes nas páginas 22, 25 e 75.

REKHTER, M. et al. Genetic ablation of IRAK4 kinase activity inhibits vascular lesion formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 367, n. 3, p. 642–648, 2008. ISSN 0006291X. Citado na página 21.

RIOS, F. J. O. et al. Uptake of oxLDL and IL-10 Production by Macrophages Requires PAFR and CD36 Recruitment into the Same Lipid Rafts. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, 2013. ISSN 19326203. Citado 2 vezes nas páginas 71 e 72.

RIOS, F. J. O.; GIDLUND, M.; JANCAR, S. Pivotal role for platelet-activating factor receptor in CD36 expression and oxLDL uptake by human monocytes/macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 27, n. 3-4, p. 363–372, 2011. ISSN 10158987. Citado 4 vezes nas páginas 15, 72, 73 e 76.

RIOS, F. J. O. et al. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. *PLoS ONE*, v. 7, n. 5, 2012. ISSN 19326203. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 73.

ROBERTS, K. A.; WOO, M. M.; RUTLEDGE, J. C. Nitric Oxide Mediates LDL Uptake in the Artery Wall in Response to High Concentrations of 17 -Estradiol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 17, n. 10, p. 2123–2131, 1997. ISSN 1079-5642. Disponível em: <http://atvb.ahajournals.org/content/17/10/2123.full>. Citado na página 22.

ROSENSON, R. S.; SHOTT, S.; TANGNEY, C. C. Hypertriglyceridemia is associated with an elevated blood viscosity Rosenson: Triglycerides and blood viscosity. *Atherosclerosis*, v. 161, n. 2, p. 433–439, 2002. ISSN 00219150. Citado na página 17.

RUYSSCHAERT, J. M.; LONEZ, C. *Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling*. 2015. 1860–1867 p. Citado na página 72.

SALOMON, R. G. *Structural identification and cardiovascular activities of oxidized phospholipids*. 2012. 930–946 p. Citado na página 20.

SÁNCHEZ, F. A. et al. Internalization of eNOS via caveolae regulates PAF-induced inflammatory hyperpermeability to macromolecules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol. Oct*, v. 295, n. 4, p. 1642–1648, 2008. Citado na página 76.

SÁNCHEZ, F. A. et al. Functional significance of differential eNOS translocation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 291, p. 1058–1064, 2006. Citado na página 76.

SANZ, M. J. et al. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *British journal of pharmacology*, v. 134, n. 2, p. 305–312, 2001. ISSN 0007-1188. Citado na página 18.

SCHODEL, J. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase splice variants in atherosclerotic plaques of apoE knockout mice. *Atherosclerosis*, v. 206, n. 2, p. 383–389, 2009. ISSN 1879-1484. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19358992$\delimiter"026E30F$nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757486/pdf/nihms119455.pdf>. Citado na página 18.

SCHRIJVERS, D. M. et al. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovascular Research*, v. 73, n. 3, p. 470–480, 2007. ISSN 00086363. Citado na página 20.

SHECHTER, I. et al. The metabolism of native and malondialdehyde-altered low density lipoproteins by human monocyte-macrophages. *Journal of lipid research*, v. 22, n. 1, p. 63–71, 1981. ISSN 0022-2275. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6260883>. Citado na página 20.

SHEEDY, F. J. et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature immunology*, v. 14, n. 8, p. 812–20, 2013. ISSN 1529-2916. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3720827{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 15.

SHI, X. Z.; ZHONG, X.; YU, X. Q. Drosophila melanogaster NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, n. 8, p. 545–556, 2012. ISSN 09651748. Citado na página 21.

SMIRNOVA, I. V.; SAWAMURA, T.; GOLIGORSKY, M. S. Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency. *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 287, n. 1, p. F25–32, 2004. ISSN 1931-857X. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010359>. Citado na página 22.

SONG, T. et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS Letters*, v. 570, n. 1-3, p. 133–137, 2004. ISSN 00145793. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 78.

SPEER, T. et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of toll-like receptor-2. *Immunity*, v. 38, n. 4, p. 754–768, 2013. ISSN 10747613. Citado na página 21.

STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz*, v. 29, n. 8, p. 741–748, 2004. ISSN 03409937. Disponível em: <<GotoISI>://000226800600003>. Citado na página 17.

STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 30, n. 12, p. 2311–2316, 2010. ISSN 1524-4636. Citado na página 20.

STEWART, C. R. et al. *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer.* 2010. 155–61 p. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2809046{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado 6 vezes nas páginas 15, 19, 21, 24, 72 e 76.

STOLETOV, K. et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish. *Circulation Research*, v. 104, n. 8, p. 952–960, 2009. ISSN 00097330. Citado na página 21.

SU, X. et al. Oxidized low density lipoprotein induces bone morphogenetic protein-2 in coronary artery endothelial cells via Toll-like receptors 2 and 4. *The Journal of biological chemistry*, v. 286, n. 14, p. 12213–12220, 2011. ISSN 1083-351X. Citado na página 19.

SUN, L. et al. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Molecular Cell*, v. 14, n. 3, p. 289–301, 2004. ISSN 10972765. Citado na página 22.

SUZUKI, H. et al. *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection.* 1997. 292–296 p. Citado na página 15.

SUZUKI, N. et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*, v. 416, n. April, p. 750–756, 2002. ISSN 00280836. Citado na página 23.

TAKAOKA, A. et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, v. 434, n. 7030, p. 243–249, 2005. ISSN 0028-0836. Citado na página 23.

THORNE, R. F. et al. CD36 is a receptor for oxidized high density lipoprotein: Implications for the development of atherosclerosis. *FEBS Letters*, v. 581, n. 6, p. 1227–1232, 2007. ISSN 00145793. Citado na página 15.

TRIANTAFILOU, M. et al. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 41, p. 31002–31011, 2006. ISSN 00219258. Citado 5 vezes nas páginas 15, 18, 19, 72 e 76.

TSUTSUI, M. Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, v. 11, n. 2, p. 41–8, 2004. ISSN 1340-3478. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153662>. Citado na página 77.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. In: *European Heart Journal*. [S.l.: s.n.], 1997. v. 18, n. SUPPL. E. ISBN 0012-6667. ISSN 0195668X. Citado na página 77.

WALTON, K. A. et al. Receptors involved in the oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine-mediated synthesis of interleukin-8: A role for toll-like receptor 4 and a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 32, p. 29661–29666, 2003. ISSN 00219258. Citado na página 19.

WANG, Z.; CHABOT, J.-G.; QUIRION, R. On the possible role of ERK, p38 and CaMKII in the regulation of CGRP expression in morphine-tolerant rats. *Molecular pain*, v. 7, n. 1, p. 68, 2011. ISSN 1744-8069. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3190348{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado na página 25.

WEBB, N. R.; MOORE, K. J. Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy. *Current drug targets*, v. 8, n. 12, p. 1249–63, 2007. ISSN 1873-5592. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220702>. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 20.

WEISSMAN, B. A. et al. Activation and inactivation of neuronal nitric oxide synthase: characterization of Ca2+-dependent [125I]Calmodulin binding. *European Journal of Pharmacology*, v. 435, n. 1, p. 9–18, jan 2002. ISSN 00142999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299901015606>. Citado na página 24.

WEST, X. Z. et al. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature*, v. 467, n. 7318, p. 972–6, 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09421>. Citado na página 19.

WILCOX, J. N. et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 17, n. 11, p. 2479–2488, 1997. ISSN 10795642. Citado na página 77.

WINTHER, M. P. de et al. Scavenger receptor deficiency leads to more complex atherosclerotic lesions in APOE3Leiden transgenic mice. *Atherosclerosis*, v. 144, n. 2, p. 315–321, 1999. ISSN 0021-9150. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{_}u>. Citado na página 20.

XIE, Q.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, v. 269, n. 7, p. 4705–8, 1994. Citado na página 24.

XU, X. H. et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation*, v. 104, n. 25, p. 3103–3108, 2001. ISSN 0009-7322. Citado na página 19.

YANG, K. et al. Oxidized Low-Density Lipoprotein Promotes Macrophage Lipid Accumulation via the Toll-Like Receptor 4-Src Pathway. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, v. 79, n. 11, p. 2509–2516, 2015. ISSN 1347-4820 (Electronic). Citado 2 vezes nas páginas 70 e 72.

YANG, S.-H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, v. 513, n. 1, p. 1–13, 2013. ISSN 0378-1119. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811191201311X>. Citado na página 23.

YEN, D. H. T. et al. Protein kinase A-dependent neuronal nitric oxide synthase activation mediates the enhancement of baroreflex response by adrenomedullin in the nucleus tractus solitarii of rats. *Journal of biomedical science*, BioMed Central Ltd, v. 18, n. 1, p. 32, 2011. ISSN 1423-0127. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3115842{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 75.

YU, B.; WRIGHT, S. D. Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 8, p. 4100–4105, 1996. ISSN 00219258. Citado na página 22.

ZANONI, I. et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, Elsevier, v. 147, n. 4, p. 868–80, nov 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0092867411012219/fulltext>. Citado 4 vezes nas páginas 22, 23, 75 e 76.

ZHAN, L. et al. Activation of Akt/FoxO and inactivation of MEK/ERK pathways contribute to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by delayed hypoxic postconditioning in adult rats. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 5, p. 873–882, 2012. ISSN 00283908. Citado na página 78.

ZHAO, M. et al. The role of TLR4-mediated PTEN/PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway in neuroinflammation in hippocampal neurons. *Neuroscience*, v. 269, p. 93–101, 2014. ISSN 18737544. Citado na página 75.

ZHAO, Z. et al. S-nitrosylation of ARH is required for LDL uptake by the LDL receptor. *Journal of lipid research*, v. 54, p. 1550–9, 2013. ISSN 0022-2275. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23564733>. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 70.

ZHOU, L.; ZHU, D.-Y. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric oxide*, v. 20, n. 4, p. 223–230, 2009. ISSN 1089-8611. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2009.03.001>. Citado na página 25.

ZOU, J.; SHANKAR, N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF-κB Signaling Pathways in the Regulation of Phagocytosis and Proinflammatory Cytokine Expression in Response to E. faecalis Infection. *PloS one*, v. 10, n. 8, p. e0136947, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0136947>. Citado na página 23.

Anexos