UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL NO TECIDO ADIPOSEO
PERIVASCULAR E SEU PAPEL NAS ALTERAÇÕES VASCULARES
EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE**

RAFAEL MENEZES DA COSTA

RIBEIRÃO PRETO-SP

2015

RAFAEL MENEZES DA COSTA

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL NO TECIDO ADIPOSEO
PERIVASCULAR E SEU PAPEL NAS ALTERAÇÕES VASCULARES
EM MODELO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Aleixo
Tostes Passaglia

RIBEIRÃO PRETO-SP

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP
Universidade de São Paulo
Ficha Catalográfica

Costa, Rafael Menezes da.

Disfunção mitocondrial no tecido adiposo perivascular e seu papel nas alterações vasculares em modelo experimental de obesidade. Ribeirão Preto, 2015. 121 p., 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo – Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Tostes, Rita de Cássia

1. Tecido adiposo perivascular. 2. Obesidade. 3. Mitocôndria 4. Espécies reativas de oxigênio. 4. Reatividade vascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Rafael Menezes da Costa

Título: Disfunção mitocondrial no tecido adiposo perivascular e seu papel nas alterações vasculares em modelo experimental de obesidade.

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Aleixo
Tostes Passaglia

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Dedicatória

À Deus pelo dom da vida, saúde e pela concessão de sabedoria e
discernimento para as decisões tomadas até aqui!

À minha mãe Anete Menezes e ao meu irmão José Ricardo:

Os alicerces e exemplos para que eu conseguisse continuar
minha caminhada. Obrigado por tudo!

Agradecimentos

Acreditar não significa estar livre de momentos difíceis, mas ter a força para enfrentar sabendo que não estamos sozinhos!

À Deus acima de todas as coisas!

Sou imensamente grato à minha família, minha mãe Anete e meu irmão Ricardo, pelo amor, confiança, incentivo e compreensão que tiveram durante todos esses anos no qual estive fora de casa.

À todos os membros da família Menezes, família Costa e Roney. As orações, palavras de incentivo, afago e carinho me mantiveram firme nessa jornada.

À Prof^a. Dr^a. Rita Tostes pelo acolhimento em seu laboratório, pelo incentivo e orientação exemplar. Sem dúvidas você foi essencial para minha formação acadêmica.

À Prof^a. Dr^a. Núbia Lobato. Obrigado por tudo! Obrigado pela amizade, inúmeras risadas, respeito e preciosas ideias. Obrigado por sempre ouvir o meu “não concordo” e a partir disso me ajudar a crescer como pessoa e pesquisador.

À Prof^a. Dr^a. Luciane Alberici e os alunos do laboratório de metabolismo mitocondrial pelas sugestões e auxílio nos experimentos de respiração celular.

À banca examinadora pelas críticas e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Juliano, meu muito obrigado pela amizade e companheirismo. O mestrado e a vida não seriam completos sem os seus conselhos e também seu carinho. Obrigado por tudo.

Ao longo desses anos de aprendizado a presença de grandes amigos foi fundamental, mesmo distante fisicamente. Agradeço imensamente pelo amor incondicional, incentivo, conselhos, lágrimas e sorrisos que tive dos meus melhores Fabi, Kalil, Fred e Iza. Obrigado pelo companheirismo e pela amizade que me fizeram crescer e superar cada desafio.

Aos amigos Paulo e Jonathas pelo convívio e por tornarem Ribeirão Preto e o Ap. 21 mais divertidos.

Aos amigos de laboratório: Fernando, Vânia, Thiago Bruder, Fernanda, Karla Bianca, Rhéure, Camila Zanotto, Marcondes, Thiago Dias, Nathanne, Camila André, Rafael, Pedro, Carla Pavan e Fabíola, pela colaboração, pelos ensinamentos e pelo convívio agradável.

Aos funcionários do departamento de farmacologia da FMRP-USP, em especial à Soninha, Fátima Helena, Ramon, Eliana e Eleni pelo carinho e atenção.

Ao apoio financeiro do CNPq e CAPES.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho o meu muito obrigado!!

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a
eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

Albert Einstein

Resumo

COSTA, RM. Disfunção mitocondrial no tecido adiposo perivascular e seu papel nas alterações vasculares em modelo experimental de obesidade. 2015. 121 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A obesidade desencadeia mudanças estruturais e funcionais no tecido adiposo perivascular (PVAT), levando a um desequilíbrio em favor de substâncias vasoconstritoras e pró-inflamatórias, bem como alterações em suas vias de sinalização no vaso. Um importante mecanismo proposto para explicar a perda do efeito anticontrátil do PVAT na obesidade é o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem papel importante na modulação da função vascular mediada pelo PVAT. Considerando que a mitocôndria representa fonte potencial de EROs nas células, o presente estudo testou a hipótese que a disfunção mitocondrial no PVAT está envolvida na perda do efeito anticontrátil do PVAT em modelo experimental de obesidade. Este estudo avaliou se a matriz mitocondrial nas células que compõem o tecido adiposo periaórtico representa fonte importante de EROs, e se as mesmas contribuem para as alterações na regulação, pelo PVAT, da reatividade vascular. Nosso estudo demonstrou que animais obesos apresentaram disfunção vascular e perda do efeito anticontrátil do PVAT. O estresse oxidativo está envolvido na disfunção do PVAT, com participação significativa da mitocôndria na geração de EROs, capazes de modular a reatividade vascular. A obesidade favoreceu a disfunção mitocondrial, reduzindo o consumo de oxigênio. Estes eventos favoreceram o aumento na geração de peróxido de hidrogênio mitocondrial no PVAT, o qual prejudica a ação anticontrátil deste tecido por ser ativador direto da via de contração RhoA/Rho cinase.

Palavras-chave: Tecido adiposo perivascular, obesidade, mitocôndria, espécies reativas de oxigênio, reatividade vascular.

Abstract

COSTA, RM. Mitochondrial dysfunction in perivascular adipose tissue and its role in obesity-associated vascular changes. 2015. 121 p. Dissertation (Master in Pharmacology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2015.

Obesity promotes structural and functional changes in the perivascular adipose tissue (PVAT), favoring the release of vasoconstrictor and proinflammatory substances, as well as altering the vascular signaling pathways activated by PVAT-derived factors. Oxidative stress is an important mechanism proposed to explain the loss of anticontractile effects of the PVAT in obesity. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the modulatory effects of PVAT on vascular function. Considering that mitochondria are a potential source of ROS in the cells, the present study tested the hypothesis that mitochondrial dysfunction leads to the loss of the anticontractile effects of PVAT in obesity. We evaluated whether the mitochondrial matrix of the cells that make up the periaortic fat tissue constitute a major source of ROS, and if mROS contribute to defective regulation of vascular reactivity by the PVAT. Our study shows that obese animals exhibit vascular dysfunction and loss of anticontractile effects of PVAT. Oxidative stress is involved in PVAT dysfunction, with a significant contribution of mitochondria to ROS generation. Obesity promotes mitochondrial dysfunction, reducing oxygen consumption. These events increase the generation of mitochondrial hydrogen peroxide in the PVAT, which impairs the anticontractile effects of this tissue via direct activation of the RhoA / Rho kinase pathway.

Key words: Perivascular adipose tissue, obesity, mitochondria, reactive oxygen species, vascular reactivity.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

$\Delta\psi_m$	potencial eletroquímico de membrana
ACh	acetilcolina
ADP	adenosina difosfato
ADRFs	fator relaxante derivado da adventícia (<i>adventitium-derived relaxing factor</i>)
AMPK	proteínas cinase ativadas por adenosina monofosfato
ANOVA	análise de variância
ApoE	apolipoproteína E
ATP	adenosina trifosfato
Ca²⁺	cálcio
CCCP	carbonil cianida 3-clorofenil-hidrazona
CONCEA	conselho nacional de controle de experimentação animal
Cu/ZN-SOD	cobre/zinco superóxido dismutase
DHE	dihidroetidina
DMSO	dimetilsulfóxido
E.P.M.	erro padrão da média
EC₅₀	concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
ec-SOD	superóxido dismutase extracelular
EDCFs	fator contrátil derivado do endotélio (<i>endothelium-derived contractile factor</i>)
EDRFs	fator relaxante derivado do endotélio (<i>endothelium-derived relaxing factor</i>)
Emáx	resposta máxima
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina-adenina dinucleotídeo
FE	fenilefrina
FMN	flavina mononucleotídeo
H₂O	água
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HDL	lipoproteínas de alta densidade (<i>high density lipoproteins</i>)
IMC	índice de massa corporal
K⁺	potássio
KCl	cloreto de potássio
LDL	lipoproteínas de baixa densidade (<i>low density lipoproteins</i>)
MAPKs	proteínas cinase ativadas por mitógenos
MLV	músculo liso vascular

mN	miliNewton
Mn-SOD	manganês superóxido dismutase
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
NZO	Nova Zelândia (<i>new zealand</i>)
O₂	oxigênio
O₂⁻	ânion superóxido
pD₂	logaritmo negativo da concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
PVAT	tecido adiposo perivascular (<i>perivascular adipose tissue</i>)
PVRFs	fator relaxante derivado do PVAT (<i>PVAT-Derived Relaxing Factor</i>)
sGC	guanilato ciclase solúvel
SOD	superóxido dismutase
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
Tiron	4,5-dihidroxi- ácido 1,3-benzenodisulfônico dissódico monohidratado
TOTG	teste oral de tolerância à glicose
UCP	proteína desacopladora mitocondrial (<i>uncoupling protein</i>)
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade (<i>very low density lipoproteins</i>)

Lista de figuras

Figura 1. Esquema representativo da cadeia respiratória	33
Figura 2. Esquema representativo da hipótese do trabalho	39
Figura 3. Ganho de massa corporal dos animais mantidos em dieta controle e animais mantidos em dieta hiperlipídica	52
Figura 4. Concentrações de glicose e insulina e avaliação da sensibilidade à insulina	55
Figura 5. Avaliação da tolerância à glicose	56
Figura 6. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove disfunção vascular	57
Figura 7. A obesidade compromete a ação anticontrátil do PVAT	60
Figura 8. A obesidade induz aumento da geração de EROs no PVAT	62
Figura 9. EROs modulam os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT	64
Figura 10. EROs mitocondriais modulam os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT ...	67
Figura 11. Ânion superóxido mitocondrial modula os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT	70
Figura 12. Peróxido de hidrogênio modula os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT ..	73
Figura 13. Esquema representativo da respiração do PVAT da aorta torácica de camundongos controles e obesos	75
Figura 14. A obesidade diminui a respiração basal da mitocôndria no PVAT	76
Figura 15. A obesidade aumenta a geração basal de peróxido de hidrogênio mitocondrial no PVAT	78
Figura 16. A obesidade diminui a expressão proteica da Mn-SOD no PVAT	79
Figura 17. A obesidade aumenta a expressão proteica da catalase no PVAT	80
Figura 18. A obesidade diminui a expressão proteica de UCP-1 no PVAT	81
Figura 19. A obesidade não modifica expressão de proteínas mitocondriais no PVAT ..	83

Figura 20. A via Rho/RhoA cinase está envolvida nos efeitos vasculares promovidos pelo PVAT na obesidade	85
Figura 21. A obesidade favorece o relaxamento induzido pelo Y27632	87
Figura 22. O peróxido de hidrogênio está envolvido nos efeitos do PVAT sobre a vasodilatação induzida pelo Y27632	90
Figura 23. A presença do PVAT na condição de obesidade promove aumento na fosforilação da MYPT-1 no MLV	93

Lista de tabelas

Tabela 1. Macronutrientes e micronutrientes das rações (%)	44
Tabela 2. Lista de anticorpos primários	49
Tabela 3. Perfil nutricional e caracterização da obesidade	53
Tabela 4. Perfil lipídico dos animais mantidos em dieta controle e hiperlipídica	54
Tabela 5. Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos na presença (+) e na ausência (-) de endotélio	58
Tabela 6. Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos, circundados ou não por PVAT, na presença (+) e na ausência (-) de endotélio	61
Tabela 7. Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com Tiron ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT	65
Tabela 8. Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com CCCP ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT	68
Tabela 9. Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com MnTMPyP ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT	71
Tabela 10. Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com Peg-catalase ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT	74
Tabela 11. Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com Y27632 ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT	86
Tabela 12. Valores de pD_2 do Y27632 em anéis de aortas de animais controles e obesos, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT	88
Tabela 13. Valores de pD_2 da Y27632 em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com Peg-catalase ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT	91

Sumário

Introdução	23
Obesidade e o sistema cardiovascular	24
Tecido adiposo perivascular e a disfunção vascular na obesidade	26
Papel da mitocôndria na disfunção vascular na obesidade	32
 Justificativa e hipótese	 38
 Objetivos	 40
Objetivo geral	41
Objetivos específicos	41
 Materiais e métodos	 42
Animais	43
Indução da obesidade	43
Perfil nutricional e caracterização da obesidade	44
Obtenção do sangue e do PVAT	45
Perfil lipídico	45
Determinação das concentrações de glicose e insulina plasmática	45
Avaliação da sensibilidade à insulina pelo Índice de HOMA-IR	46
Teste oral de tolerância à glicose	46
Estudo da reatividade vascular em anéis de aorta isolada	46
Quantificação proteica por Western Blotting no PVAT	48
Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT	49
Respiração e medidas da produção de peróxido de hidrogênio mitocondriais	50
Análise estatística	50
 Resultados	 51
Evolução ponderal dos animais mantidos em dieta controle e dieta hiperlipídica	52
Perfil nutricional e caracterização do modelo de obesidade	53
Perfil lipídico	54
Concentrações de glicose e insulina e avaliação da sensibilidade à insulina	55
Avaliação da tolerância à glicose	56
Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a resposta contrátil à FE	57
Efeito da obesidade sobre a ação anticontrátil do PVAT	59

Efeito da obesidade sobre a geração de EROs no PVAT	62
Participação das EROs sobre os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT	63
Efeito do desacoplamento mitocondrial sobre perda do efeito anticontrátil do PVAT .	66
Participação do ânion superóxido na perda do efeito anticontrátil do PVAT	69
Participação do peróxido de hidrogênio na perda do efeito anticontrátil do PVAT	72
Efeito da obesidade sobre a respiração basal da mitocôndria no PVAT	75
Efeito da obesidade sobre a geração basal de peróxido de hidrogênio mitocondrial no PVAT	77
Efeito da obesidade sobre a expressão proteica da Mn-SOD no PVAT	79
Efeito da obesidade sobre a expressão proteica da catalase no PVAT e na aorta	80
Efeito da obesidade sobre a expressão proteica da UCP-1 mitocondrial no PVAT	81
Efeito da obesidade sobre a expressão de proteínas mitocondriais no PVAT	82
Avaliação do efeito vascular do PVAT na presença de um inibidor da Rho cinase	84
Avaliação do efeito vascular do PVAT no relaxamento induzido pelo Y27632	87
Participação do peróxido de hidrogênio sobre os efeitos do PVAT na vasodilatação induzida pelo Y27632	89
Efeito da obesidade e do PVAT sobre a expressão total e fosforilada da MYPT-1 no músculo liso vascular	92
Discussão	94
Conclusão	105
Referências bibliográficas	107
Anexos	119

Introdução

Obesidade e o sistema cardiovascular

A obesidade é uma condição fisiopatológica crônica de origem multifatorial, sendo definida como excesso da massa de tecido adiposo em relação à massa magra, que pode ocorrer de modo regional ou generalizado (Kopelman, 2000). Esta condição coincide com aumento de peso, embora possa ocorrer aumento da quantidade e porcentagem de gordura em indivíduos de peso normal (Kopelman, 2000). Na prática clínica, a obesidade é classificada a partir do índice de massa corporal (IMC), também conhecido como índice de Quetelet, sendo obtido pela divisão da massa corporal em quilogramas pelo quadrado da estrutura em metros (Kg/m^2) (Afonso & Sichieri, 2002).

Os mecanismos fisiopatológicos que levam ao sobrepeso (IMC, entre 25-30 kg/m^2) e à obesidade ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) estão apenas parcialmente elucidados. No entanto, o desequilíbrio crônico entre a oferta abundante de calorias provenientes da alimentação e um nível limitado de atividade física favorece o aumento dos depósitos de gordura corporal (Hill, 2006). Este processo pode também ser influenciado por fatores genéticos que interagem entre si, além de interagirem com diversos fatores ambientais e sociais, tais como estresse, sedentarismo, tabagismo e etilismo (Boutin & Froquel, 2001).

A obesidade é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade em grande parcela da população mundial, uma vez que, de modo independente, ou em associação com outras doenças, é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e desordens cardiovasculares, dentre outras condições (Afonso & Sichieri, 2002; Lopes, 2007). Os últimos dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (2014) estimam que mais de 600 milhões de adultos no mundo estejam obesos, sendo 41% representados por homens e 59% por mulheres. Nos Estados Unidos, aproximadamente 78,6 milhões de pessoas são obesas, representando um terço da população. No Brasil, aproximadamente 29,4% da população apresentam obesidade. Estas estimativas mostram um alarmante problema de saúde que aflige países industrializados e em desenvolvimento.

Quando se associa a obesidade como fator de risco para complicações cardiovasculares é importante considerar não apenas a magnitude da obesidade, mas também, e talvez este constitua o parâmetro mais relevante, a distribuição de gordura corporal. Há diferenças no risco atribuível à obesidade de acordo com a heterogeneidade de localização do

tecido adiposo entre indivíduos obesos. O tecido adiposo é amplamente encontrado na região subcutânea e na região visceral, sendo o subcutâneo localizado entre a pele e o músculo esquelético e o visceral dentro das cavidades do organismo, primariamente na cavidade abdominal (Walker et al., 2014). Este último tem sido considerado como fator de risco independente para doenças cardiovasculares, uma vez que apresenta elevada atividade metabólica, no que tange à lipólise e liberação de ácidos graxos, e secreção de citocinas, quando comparado com o adipócito da região subcutânea (Calle & Kaaks, 2004). De fato, estudos epidemiológicos demonstraram que a adiposidade visceral, avaliada pela razão cintura-quadril (Larsson et al., 1984) ou por tomografia computadorizada (Nakamura et al., 2000), está relacionada com doenças da artéria coronária, independentemente do índice de massa corporal. Neste sentido, demonstrou-se que a gordura do epicárdio, considerada um índice de adiposidade cardíaca, desempenha papel mecânico e funcional direto em anomalias do ventrículo esquerdo relacionadas com a obesidade (Iacobellis et al., 2006). Vale ressaltar que o risco de insuficiência cardíaca dobra em indivíduos obesos, quando comparados com aqueles com peso normal (Kenchiah et al., 2002; Lee et al., 2007).

As complicações clínicas observadas no sistema cardiovascular em decorrência da obesidade não estão relacionadas apenas às modificações diretas no coração e no metabolismo sistêmico, sendo que o acúmulo de tecido adiposo também resulta em modificações funcionais dos vasos sanguíneos. Em modelos animais de obesidade, por exemplo, se observa aumento dos níveis pressóricos e da contração vascular (Siddiqui & Hussain, 2006), além de redução do relaxamento vascular à acetilcolina (ACh), um vasodilatador dependente de endotélio (Kobayasi et al., 2010). A obesidade não afeta apenas as funções mediadas pelo endotélio, mas causa também diversos prejuízos no músculo liso vascular (MLV). Bender & Klabunde (2007) mostraram que artérias coronárias de animais obesos e diabéticos apresentam aumento na contração vascular desencadeada pela ativação de receptores de endotelina, a qual está associada à ativação do adreno-receptor alfa-1. Aumentos na vasoconstrição mediada por prostanóides e na expressão do gene do receptor de tromboxano também já foram descritos em modelo experimental de obesidade (Traupe et al., 2002). Outro estudo mostrou que artérias mesentéricas de resistência de animais obesos apresentam aumento na deposição de colágeno tipo 1 entre as células de músculo liso, com consequente remodelamento e prejuízos na reatividade vascular (Silva et al., 2015).

Tecido adiposo perivascular e a disfunção vascular na obesidade

Um fator de grande relevância para o entendimento da progressão das complicações vasculares em indivíduos com acúmulo de tecido adiposo é o reconhecimento de que os adipócitos são capazes de afetar a função vascular, tanto a distância quanto localmente. De fato, o acúmulo de tecido adiposo está claramente associado com perda progressiva da função vascular, não somente em artérias de grande calibre, mas também na microcirculação (Bagi et al., 2012; Barton et al., 2012). A grande questão que surge a partir destas observações é como o acúmulo excessivo de adipócitos poderia levar ao desenvolvimento de tal disfunção mesmo a distância. A resposta para esta questão é proporcionada pelas evidências de que o tecido adiposo está envolvido na produção de diversas proteínas, coletivamente chamadas de adipocinas, que são secretadas no sistema circulatório e atuam em uma série de processos fisiológicos do organismo (Wajchenberg, 2000; Fonseca-Alaniz et al., 2006). Estes processos incluem o controle do balanço energético, das respostas imunológicas, da pressão arterial, da homeostase vascular e da angiogênese, do metabolismo lipídico, glicêmico e até mesmo da sensibilidade à insulina (Prins, 2002). Em condições onde existe alteração na secreção de adipocinas pelo tecido adiposo, todas as funções moduladas pelas mesmas podem ser alteradas, como é o caso da obesidade (Dulloo et al., 2010).

O impacto das adipocinas sobre a função vascular não está limitado à regulação momentânea da liberação de fatores vasoativos derivados do endotélio ou regulação do tônus da musculatura lisa vascular. Algumas adipocinas podem também afetar profundamente o crescimento, a migração e os processos inflamatórios locais (Miao & Li, 2012). Obviamente, estas adipocinas têm se tornado biomarcadores e preditores preciosos, e o estudo das mesmas proporciona possibilidades promissoras para identificar novos alvos para o tratamento da obesidade e das complicações cardiovasculares associadas a esta condição (Bagi et al., 2012; Barton et al., 2012).

Os vasos sanguíneos normalmente são constituídos por três túnicas ou camadas, classificadas de acordo com suas características morfofisiológicas. A túnica íntima apresenta uma camada de células endoteliais apoiadas em tecido conjuntivo frouxo. Em artérias de grande calibre, observa-se a presença de uma lâmina elástica interna recoberta de fenestras, responsável pela difusão de substâncias que auxiliam na modulação do tônus vascular.

Posterior à íntima, a túnica média é constituída basicamente de músculo liso, capaz de aumentar ou diminuir a luz do vaso mediante sua capacidade contrátil. Por fim, a túnica adventícia pode ser dividida em duas subcamadas: a camada adventicial compacta, composta basicamente por colágeno do tipo 1 e fibras elásticas, e a camada de gordura adventicial, que contém basicamente células adiposas (Junqueira & Carneiro, 2008).

A camada de gordura adventicial, também conhecida como gordura perivascular (*perivascular adipose tissue* – PVAT), recobre vasos de todos os sistemas orgânicos, com exceção da região do cérebro (Ma et al., 2010). Os estudos funcionais dos vasos sanguíneos sob influência do PVAT só começaram a ser desenvolvidos a partir dos anos de 1990, uma vez que este tecido circundante era removido nos procedimentos experimentais por ser comparado ao tecido conjuntivo, no sentido de fornecer apenas suporte mecânico ao vaso. Soltis & Cassis (1991), em seus primeiros relatos, descreviam que o PVAT retinha e prejudicava a difusão dos agentes farmacológicos, justificando uma redução na resposta contrátil. Porém, estudos posteriores que utilizavam diversos agonistas de baixa lipossolubilidade (menor retenção nos adipócitos) também demonstraram tal diminuição, contestando a teoria inicial (Gollasch & Dubrovskaya, 2004). Löhn e colaboradores (2002), em ensaios experimentais, constataram que o tecido adiposo periaórtico regula o tônus vascular pela liberação de fatores anticontráteis, inicialmente definidos como fatores relaxantes derivados da adventícia (*Adventitium-Derived Relaxing Factors* – ADRFs). No entanto, o termo foi substituído por fatores relaxantes derivados do PVAT (*PVAT-Derived Relaxing Factors* – PVRFs) (Gollasch & Dubrovskaya, 2004). Diversos candidatos à PVRF são descritos na literatura, porém, as vias de sinalização e os mecanismos envolvidos no relaxamento produzido pelos PVRFs variam de acordo com o estado fisiopatológico do indivíduo.

O PVAT é atualmente reconhecido como um órgão endócrino altamente ativo que libera uma grande variedade de adipocinas e outros fatores que influenciam de modo parácrino o tônus vascular, não apenas em veias e artérias de condutância, mas também em vasos de menor calibre, considerados de suma importância na regulação da pressão arterial. Os fatores vasoativos liberados pelo PVAT em condições fisiológicas incluem PVRFs, como a adiponectina, a angiotensina-(1-7), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a leptina e o óxido nítrico (NO), os quais promovem um efeito anticontrátil benéfico e são essenciais para a manutenção da resistência vascular (Fernández-Alfonso et al., 2013).

O efeito anticontrátil dos PVRFs em condições fisiológicas já foi descrito em várias espécies e é mediado por mecanismos diferentes dependendo do leito vascular. Na aorta de ratos, tanto um relaxamento dependente quanto independente de endotélio já foi relatado. O relaxamento dependente do endotélio é mediado pela liberação de NO e posterior ativação de canais para potássio (K^+) dependentes de cálcio (Ca^{2+}), ao passo que o relaxamento independente do endotélio é mediado pela ativação de vias dependentes de tirosina cinase e pela abertura de canais para K^+ dependentes de adenosina trifosfato (ATP), bem como pela formação de H_2O_2 . Em artérias mesentéricas de ratos, os PVRFs induzem relaxamento independente do endotélio através da ativação de canais para K^+ dependentes de voltagem (Fernández-Alfonso et al., 2013).

As características estruturais e fisiológicas do PVAT variam de acordo com o leito vascular encontrado. Demonstrou-se que no leito mesentérico, o PVAT assemelha-se ao tecido adiposo branco (TAB), mostrando adipócitos menos diferenciados, com pouca vascularização e perfil de produção/secreção de citocinas específicos, além de se observar infiltrados de macrófagos, fibroblastos e células do sistema imune (Guzik et al., 2007). Por outro lado, estudos recentes têm demonstrado que o PVAT da aorta torácica exibe características que se assemelham mais ao tecido adiposo marrom (TAM) do que ao TAB (Fitzgibbons et al., 2011; Chang et al., 2012), incluindo a expressão de genes altamente ou unicamente expressos no TAM, a presença de adipócitos multiloculares e a grande abundância de mitocôndrias.

Assim como o TAM, o PVAT é ativado pelo frio e gera calor. De modo surpreendente, a ativação, induzida pelo frio, da termogênese no PVAT é acompanhada por atenuação do processo aterosclerótico em camundongos deficientes de apolipoproteína E (ApoE), ao passo que tal proteção é perdida em camundongos onde o PVAT está ausente (Chang et al., 2012). Portanto, o PVAT não só proporciona suporte mecânico ao vaso sanguíneo, mas também exerce efeitos protetores por meio de suas propriedades anticontráteis e termogênicas.

A influência anticontrátil do PVAT é diretamente dependente de sua quantidade (Verlohren et al., 2004) e, considerando que esta aumenta ao longo da vasculatura na obesidade (Somoza et al., 2007; Ma et al., 2010), seria concebível inferir que o efeito anticontrátil do PVAT estaria aumentado nestas circunstâncias. No entanto, está bem descrito

que a obesidade desencadeia mudanças estruturais e funcionais no PVAT que estariam relacionadas à disfunção endotelial e à lesão vascular. De fato, no PVAT de pacientes obesos e de modelos animais de obesidade, têm sido descritas alterações na quantidade e no padrão de expressão de adipocinas, levando a um desequilíbrio em favor de substâncias vasoconstritoras e pró-inflamatórias, bem como alterações em suas vias de sinalização no vaso (Van de Voorde et al., 2014). Neste contexto, estudo recente realizado em suínos obesos Ossabaw descreveu alterações no perfil proteômico de 186 proteínas no PVAT de artérias coronárias, as quais se correlacionam com aumento do efeito contrátil e da ativação de vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} no MLV (Owen et al., 2013).

Gao e colaboradores (2005) demonstraram que o efeito anticontrátil do PVAT foi perdido em um modelo experimental de obesidade, apesar deste apresentar quantidades mais elevadas de PVAT. Da mesma forma, camundongos obesos *New Zealand* (NZO), que apresentam síndrome metabólica severa e maior quantidade de PVAT, mostram redução do efeito anticontrátil do PVAT (Fésüs et al., 2007). Em animais tratados durante 6 meses com dieta hiperlipídica, a presença do PVAT na aorta torácica reduz a fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no resíduo de ativação Serina¹¹⁷⁷ e diminui a fosforilação de proteínas cinases ativadas por adenosina monofosfato (AMPK), uma proteína cinase que regula positivamente a atividade da eNOS. Estes efeitos se somam ao aumento da fosforilação do alvo de rapamicina mTOR, a qual regula negativamente a via AMPK-eNOS. Corroborando com estes resultados, células de músculo liso vascular co-cultivadas com adipócitos periaórticos apresentaram o mesmo padrão de expressão AMPK/mTOR, sugerindo que o PVAT destes animais obesos contribui para a disfunção endotelial (Ma et al., 2010).

As modificações estruturais e funcionais do PVAT na obesidade também estão associadas com o remodelamento vascular. Células de músculo liso de aorta de ratos Wistar Kyoto idosos e mantidas em dieta hiperlipídica, incubadas em meio de cultura celular condicionado com adipócitos periaórticos, mostram aumento significativo na taxa de crescimento. Esse efeito foi abolido na presença da proteinase K, uma enzima que desnatura proteínas, indicando que o PVAT é capaz de liberar proteínas hidrossolúveis que estimulam o crescimento de células musculares lisas, se tornando um fator agravante em doenças vasculares observadas no envelhecimento e na obesidade (Barandier, 2005).

Outro importante mecanismo proposto para explicar a perda do efeito anticontrátil do PVAT na obesidade é o estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e o H_2O_2 , possuem papel importante na modulação da função vascular mediada pelo PVAT (Gao et al., 2006; Gao et al., 2007). Diversas vias na geração de EROs ocorrem tanto nas células de MLV quanto no próprio PVAT. Fontes formadoras de EROs em diversas doenças que afetam o sistema cardiovascular incluem a xantina oxidase, a NO sintase (NOS), a NAD(P)H oxidase e a cadeia respiratória mitocondrial (Paravicini & Touyz, 2008).

A NAD(P)H oxidase, que representa a principal fonte de $O_2^{\cdot -}$ na vasculatura, também está expressa no PVAT de artérias mesentéricas de ratos (Gao et al., 2006), onde promove aumento da resposta contrátil à estimulação de nervos perivasculares. O $O_2^{\cdot -}$ é rapidamente convertido pela superóxido dismutase (SOD) a H_2O_2 , uma ERO altamente estável e permeável à célula (Fernández-Alfonso et al., 2013). A expressão das três isoformas de SOD, cobre-zinco SOD (Cu/Zn-SOD), manganês SOD (Mn-SOD) e a forma extracelular da Cu/Zn-SOD (ec-SOD), também já foi detectada no PVAT mesentérico de camundongos (Gil-Ortega et al., 2009). Recentemente nosso grupo demonstrou que o PVAT também expressa a enzima catalase, que degrada o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2), e que a expressão dessa enzima está relacionada diretamente com a modulação da função vascular mediada por EROs (Costa, et al., dados não publicados).

O H_2O_2 é descrito como uma substância vasoativa que induz tanto respostas contráteis quanto relaxantes nos vasos sanguíneos por diferentes mecanismos dependendo do tipo de vaso, do estado de contração deste vaso, de sua concentração e da espécie animal. O relaxamento induzido por H_2O_2 pode ser dependente de endotélio, como resultado do aumento da liberação de NO secundário à ativação de canais para K^+ . Além disso, o H_2O_2 induz relaxamento independente de endotélio através da abertura direta de canais para K^+ no MLV, pela oxidação de seus resíduos de cisteína, bem como pela ativação direta da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) (Ardanaz & Pagano, 2006). O efeito contrátil mediado pelo H_2O_2 ocorre devido à ativação direta da enzima ciclooxigenase e ao aumento de Ca^{2+} intracelular. Evidências indicam que o acúmulo de EROs ativa vias de contração relacionadas à proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), com aumento na fosforilação de ERK 1/2 (Peters et al., 2000). Além disso, o H_2O_2 pode ativar a via da Rho cinase, favorecendo a contração vascular através da inibição da enzima que inibe a contração mediada por Ca^{2+} , a miosina

fosfatase (Ardanaz & Pagano, 2006). De fato, a via da Rho cinase é importante não apenas na contração de células do MLV, mas também no aumento da proliferação e migração celular, o que tem atraído muita atenção com relação ao seu papel na patogênese de doenças cardiovasculares (Loirand et al., 2006). Nestas condições, o aumento da geração de EROs se torna importante sinalizador do aumento da contração vascular.

Considerando que o $O_2^{\cdot -}$ induz contração vascular enquanto o H_2O_2 pode promover efeito dual, o resultado final da ação destas EROs irá depender do equilíbrio relativo entre a produção e a liberação destes fatores pelo PVAT, sendo que, a atividade das SODs e da catalase pode ser crucial neste processo (Gil-Ortega et al., 2009). Ketonen e colaboradores (2010) demonstraram em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica que a redução no relaxamento dependente de endotélio ocorre devido ao estresse oxidativo no PVAT, caracterizado por aumento na produção de $O_2^{\cdot -}$ e de H_2O_2 . Outro estudo, utilizando também o modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, demonstrou que a disfunção endotelial foi agravada na presença do PVAT (Gil-Ortega et al., 2009). Aumento da atividade da NAD(P)H oxidase e da produção de $O_2^{\cdot -}$, associados à diminuição da expressão da atividade da SOD total e da ecSOD, foram descritos no PVAT destes animais. Estas alterações foram acompanhadas por redução na expressão da eNOS e na produção de NO no PVAT destes animais (Gil-Ortega et al., 2009). Similarmente, em camundongos NZO, o aumento na formação de $O_2^{\cdot -}$ e a redução da expressão da SOD no PVAT contribuem para a disfunção vascular via redução dos efeitos anticonstráteis deste tecido (Marchesi et al., 2009).

Papel da mitocôndria na disfunção vascular na obesidade

Além da NAD(P)H oxidase, a mitocôndria também é considerada uma importante fonte na geração de EROs (Kowaltowski et al., 2009). Esta organela é essencial para a sobrevivência e o funcionamento celular, pois desenvolve um importante papel na geração de energia, na regulação da apoptose e na homeostasia do Ca^{2+} intracelular (Mcbride et al., 2006). No entanto, a disfunção mitocondrial reflete no aumento da geração de EROs e está associada a diversos distúrbios metabólicos que ocorrem no diabetes e na obesidade, tais como resistência à insulina, hiperglicemia e aumento na circulação de ácidos graxos livres (Krauss et al., 2003; Joseph et al., 2004).

A produção de EROs na mitocôndria ocorre pela via de fosforilação oxidativa acoplada à cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória), ambas envolvidas na produção de energia por esta organela. Este processo compreende a fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) em ATP, utilizando a energia gerada nas reações de óxido-redução intracelulares (Maley & Plaut, 1954).

A cadeia respiratória consiste de uma série de proteínas que possuem grupos prostéticos fortemente ligados, capazes de aceitar e doar elétrons. Nas células eucarióticas, diversas enzimas, moléculas transportadoras de elétrons e sistemas de transporte de membrana estão localizados no compartimento interno da mitocôndria (Nelson & Cox, 2006).

Cinco complexos de proteínas e co-fatores associados com a fosforilação oxidativa foram isolados da membrana mitocondrial interna. Cada complexo efetua uma etapa separada do processo de transdução de energia e os diferentes complexos são designados pelos números I a V. Quatro deles, I a IV (NADH-ubiquinona redutase, succinato-ubiquinona redutase, ubiquinol-citocromo c redutase e citocromo oxidase, respectivamente) estão envolvidos na transferência de elétrons enquanto o complexo V (ATP sintase) é o responsável pela síntese final de ATP. Os co-fatores envolvidos são a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), a flavina mononucleotídeo (FMN), a flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), a coenzima Q e diversos citocromos (Osellame et al., 2012).

Na membrana mitocondrial interna, elétrons provenientes das coenzimas NAD e FADH_2 são transferidos para o complexo I, o qual contém a FMN como grupo prostético. Através de uma série de centros de ferro e enxofre, os elétrons são, então, transferidos para a

coenzima Q, que os transfere para o complexo III. Os elétrons são sucessivamente transferidos para os citocromos *c* e então, para o complexo IV. A passagem dos elétrons através destas sequências de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de prótons H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana, contra seu gradiente de concentração, formando um potencial eletroquímico de membrana ($\Delta\psi_m$) (Fig. 1). O complexo II catalisa a oxidação da $FADH_2$ em FAD, utilizando o succinato como substrato. Essa reação não libera energia livre suficiente para sintetizar ATP, servindo somente para injetar prótons na cadeia respiratória (Nelson & Cox, 2006).

Fig. 1 – Esquema representativo da cadeia respiratória.

A citocromo oxidase transfere os elétrons para o O_2 , o qual requer quatro elétrons e quatro íons H^+ para ser completamente reduzido a duas moléculas de H_2O (Ferreira et al., 2008). Para a célula é muito importante que a molécula de O_2 , aceitando quatro elétrons, seja completamente reduzida a duas moléculas de H_2O . Se o O_2 for parcialmente reduzido pela recepção de somente dois elétrons, o produto é o H_2O_2 . Se o O_2 receber somente um elétron, o produto será o $O_2^{\cdot -}$ (Kowaltowski et al., 2009).

A geração de EROs na mitocôndria é regulada por diversos fatores, dos quais se destacam as proteínas desacopladoras mitocondriais (*Uncoupling Protein* – UCP). As UCPs são proteínas reguladoras da fosforilação oxidativa, dissipando os substratos utilizados na síntese de ATP em forma de calor (Bianco, 2000). A ativação das UCPs na membrana interna da mitocôndria permite que prótons possam retornar para a matriz mitocondrial, reduzindo assim o potencial de membrana e a geração de EROs. As UCPs formam uma classe dentro da

família de carreadores aniônicos mitocondriais, inicialmente denominadas de termogeninas (Nicholls, 2001). Porém, após a sua devida caracterização em TAM de camundongos por Ricquier & Kader (1976), a sigla UCP passou a ser oficialmente empregada. Existem três isoformas de UCP, localizadas em diversos tecidos. A primeira UCP identificada foi UCP-1, envolvida com a principal função fisiológica do TAM, que é de termogênese. A função termogênica da UCP-1 foi caracterizada em mamíferos hibernantes (Nicholls & Rial, 1999), em mamíferos recém-nascidos adaptados ao frio (Argyropoulos & Harper, 2002) e durante a termogênese induzida por dieta em pequenos roedores (Erlanson-Albertsson, 2003).

Aproximadamente 2-3% do O_2 consumido pela mitocôndria é convertido em $O_2^{\cdot -}$ em passos intermediários da cadeia respiratória mitocondrial, principalmente nos complexos I e III (Cadenas et al., 1977; Turrens & Boveris, 1980). A maior taxa de produção de EROs ocorre quando o gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna é alto e o consumo de O_2 , via demanda de ATP, é baixo. O excesso de ingestão de calorias e o baixo gasto energético podem causar aumento do gradiente de prótons e menor demanda de ATP. Nestas circunstâncias, a maioria dos complexos da cadeia são ocupados por elétrons, e estes são transferidos ao O_2 , sem que ocorra a produção de ATP. Sendo assim, a geração de EROs é diretamente proporcional ao gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna (Kowaltowski et al., 1999). Apesar dos mecanismos protetores intracelulares, incluindo a SOD, a catalase e a glutathione peroxidase, o excesso de EROs é prejudicial para a célula. EROs geradas na mitocôndria promovem danos em proteínas, no DNA e em componentes lipídicos da membrana, aumentando a frequência de mutações e estimulando processos pró-inflamatórios, o que caracteriza a disfunção mitocondrial (Green & Reed, 1998; Green & Kroemer, 2005).

Dada a importância das mitocôndrias no metabolismo oxidativo e na geração de EROs, é possível deslumbrar seu papel nas síndromes metabólicas. O comprometimento mitocondrial em células adiposas de indivíduos obesos está relacionado com redução da atividade do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), da beta-oxidação e de enzimas da cadeia de transporte de elétrons, especificamente os complexos I e III (Fromenty et al., 2004). Além disso, em indivíduos pré-diabéticos e diabéticos obesos ocorre redução na expressão de genes envolvidos na fosforilação oxidativa, diminuindo a razão de produção/consumo de O_2 , favorecendo a geração de EROs mitocondriais (Crunkhorn et al., 2007).

Há muitas evidências que apoiam o conceito de que as mitocôndrias desempenham papel crítico na disfunção vascular observada na obesidade. No entanto, a questão se tal disfunção é causa ou consequência do mau funcionamento mitocondrial não está esclarecida. O equilíbrio na geração basal (fisiológica) de EROs pela mitocôndria é importante na manutenção do sistema vascular, mantendo a função endotelial e o tônus da musculatura lisa (Zhang & Gutterman, 2006). Todavia, na obesidade ocorre a perda desse equilíbrio e a geração exagerada de EROs leva a danos na função vascular. Em adição, foi demonstrado em artérias cerebrais de ratos obesos Zucker a perda do relaxamento induzido por diazoxida, um agente despolarizante seletivo de canal mitocondrial para K^+ dependente de ATP. A despolarização mitocondrial gera pequenas concentrações de EROs que estimulam a eNOS a produzir NO. Nos ratos obesos, a despolarização da mitocôndria aumenta consideravelmente essa geração de EROs, prejudicando as vias de sinalização relacionadas ao relaxamento e favorecendo a contração vascular (Erdos et al., 2004; Katakam et al., 2008).

A disfunção mitocondrial nos adipócitos de pacientes obesos aumenta o estado pró-oxidativo do retículo endoplasmático, via geração de EROs, comprometendo a homeostasia desta organela, que é importante no controle da transcrição e do enovelamento da adipocina adiponectina (Medina-Gómez, 2012). A redução na expressão de adiponectina compromete seus efeitos na vasculatura, tais como a vasodilatação dependente de endotélio, a redução no remodelamento do músculo liso vascular e a inibição dos efeitos das EROs no endotélio (Fonseca-Alaniz et al., 2006).

Um estudo recente de Pung e colaboradores (2012) mostrou que ratos obesos Zucker apresentam maior crescimento de células de músculo liso na artéria coronária, aumentando a possibilidade de doenças isquêmicas no coração. Neste estudo, mitocôndrias isoladas da artéria coronária apresentam aumento do consumo de O_2 , redução da atividade de enzimas antioxidantes e, consequentemente, maior acúmulo de EROs. Quando estes animais foram tratados com MitoTEMPO, um antioxidante seletivo de mitocôndrias, houve redução no consumo de O_2 , diminuição de EROs e reversão do fenótipo da artéria.

O mau funcionamento mitocondrial contribui para danos diretos no coração de indivíduos obesos. Camundongos alimentados com dieta rica em gordura e açúcar mostram aumento na formação de EROs a partir do complexo II mitocondrial em células de músculo cardíaco. Este fato está associado à redução da atividade da enzima antioxidante glutational

peroxidase, com consequente acúmulo de H_2O_2 , e modificações oxidativas causadas pelo $\text{O}_2^{\cdot -}$ em aminoácidos (cisteínas), componentes de proteínas importantes para a geração de ATP e controle da liberação de Ca^{2+} (Sverdlov et al., 2014).

Uma informação importante que correlaciona a disfunção mitocondrial com a obesidade foi demonstrada no estudo de Fritch e colaboradores (2004). Neste estudo foi realizada uma análise da expressão de proteínas mitocondriais e, surpreendentemente, observou-se redução significativa de aproximadamente 50% na transcrição de genes provenientes do núcleo celular e do DNA mitocondrial de adipócitos de animais obesos ob/ob. Esta redução é acompanhada pela diminuição da atividade biológica de enzimas relevantes na bioenergética mitocondrial. Estudos recentes ainda têm demonstrado que a disfunção mitocondrial está associada à resistência a insulina no músculo esquelético (Dumas et al., 2009), bem como em outros tecidos, incluindo fígado (Auger et al., 2015), pâncreas (Blake & Trounce, 2014) e rim (Che et al., 2013).

Justificativa e hipótese

Vários estudos têm demonstrado que substâncias liberadas pelo TAB são importantes reguladores endócrinos do metabolismo energético e estão envolvidos no desenvolvimento de complicações metabólicas e cardiovasculares associadas à obesidade. De grande relevância, evidências recentes destacam o papel parácrino exercido pelo tecido adiposo localizado em torno da vasculatura, conhecido como PVAT. Este tecido é considerado um componente funcional da vasculatura, capaz de produzir e secretar uma variedade de moléculas bioativas que contribuem para a regulação da reatividade vascular, da proliferação celular e de processos inflamatórios locais.

Estudos recentes têm demonstrado que o PVAT exibe características histológicas e funcionais que se assemelham ao TAM, incluindo a grande abundância de mitocôndrias e a atividade termogênica. De fato, estudos preliminares de reatividade vascular, realizados em nosso laboratório, utilizando aortas de ratos Wistar, indicam que o tecido adiposo periaórtico participa da modulação da resposta contrátil da aorta através da produção de EROs mitocondriais, cujas ações se somam às das dos fatores relaxantes e contráteis gerados pelo sistema vascular. Portanto, o presente estudo testou a hipótese de que a disfunção mitocondrial no PVAT está envolvida nas alterações vasculares observadas em modelo experimental de obesidade. Em suma, este estudo avaliou se a matriz mitocondrial nas células que compõem o tecido adiposo periaórtico pode se constituir em uma fonte importante de EROs, as quais participam das alterações na regulação da reatividade vascular exercida por este tecido. A fig. 2 mostra um esquema representativo da hipótese deste estudo.

Fig. 2 – Esquema representativo da hipótese deste estudo.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o papel das EROs geradas a partir da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial na perda do efeito anticontrátil do tecido adiposo periaórtico em modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do PVAT na resposta contrátil à fenilefrina (FE) em anéis de aorta torácica com e sem endotélio de animais controles e obesos;
- Determinar se os efeitos promovidos pelo PVAT sobre a resposta contrátil à FE são mediados por EROs geradas a partir da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial do tecido adiposo periaórtico;
- Determinar quais vias de sinalização estão sendo modificadas pelas EROs geradas a partir da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial do tecido adiposo periaórtico e como elas contribuem para as alterações de reatividade vascular produzidas por este tecido na obesidade.

Materiais e métodos

Animais

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 149/2014), que segue os princípios éticos em experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Camundongos C57BL/6J machos, de 35 dias de idade, foram adquiridos do Biotério Central da Universidade de São Paulo – *Campus* de Ribeirão Preto e mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno (comprimento [30] x largura [20] x altura [13] cm e 5 animais por caixa), acondicionadas em ambiente com temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade de $50 \pm 5\%$ e ciclos claro-escuro de 12h, com livre acesso à água e ao alimento. Os camundongos foram divididos em dois grupos experimentais: 1) camundongos mantidos em dieta controle (Controle); 2) camundongos mantidos em dieta hiperlipídica (Obeso).

Indução da obesidade

Após uma semana de aclimatização, camundongos receberam ração controle (PragSoluções, Brasil) ou ração hiperlipídica (PragSoluções, Brasil) cujo conteúdo calórico foi de 3,4 kcal/g e 9,6 kcal/g, respectivamente, baseado no estudo de De Souza e colaboradores (2005) (Tabela 1). Os animais foram submetidos às dietas controle ou hiperlipídica durante 18 semanas, a partir da 6ª semana de idade.

Tabela 1 – Macronutrientes e micronutrientes das rações (%).

Componentes	Rações	
	Controle	Hiperlipídica
Amido de milho	46,57	0,00
Caseína	14,00	20,85
L-cistina	0,18	0,39
Amido dextrinizado	15,50	5,15
Sacarose	10,00	7,90
Óleo de soja	4,00	3,23
Banha	0,00	50,66
Celulose microcristalina	5,00	5,46
Mix mineral PSB100026	0,00	1,29
Mix mineral AIN 93 M	3,50	0,00
Fosfato de cálcio dibase	0,00	1,68
Carbonato de cálcio	0,00	0,71
Citrato de potássio	0,00	1,13
Mix vitamina AIN 93	1,00	1,29
Bitartarato de colina	0,25	0,26

Perfil nutricional e caracterização da obesidade

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão calórica, eficiência alimentar, além da massa e gordura corporal. A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada ração ($g \times Kcal$). Com a finalidade de analisar a capacidade do animal converter a energia consumida em massa corporal, a eficiência alimentar foi calculada, dividindo-se o ganho total de massa corporal (g) pela energia total ingerida (Kcal). A massa corporal dos animais foi aferida semanalmente e a obesidade foi caracterizada pelo índice de adiposidade {[gordura corporal (g)/massa corporal final (g)] $\times 100$ }, sendo a gordura corporal calculada pela soma das gorduras epididimal, retroperitoneal e visceral (Taylor & Phillips, 1996).

Obtenção do sangue e do PVAT

Os camundongos foram submetidos a privação alimentar de 6 horas (período de 01:00 – 07:00 horas), anestesiados com isoflurano e as amostras de sangue foram coletadas pela retirada do globo ocular e transferidas para tubos com e sem EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético – *Ethylenediamine tetraacetic acid*) (BD Biosciences).

Perfil lipídico

Para avaliação do perfil lipídico, foram determinados os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e HDL (Lipoproteínas de alta densidade – *High density lipoproteins*), por métodos enzimáticos (Liu et al., 2015), em amostras de soros obtidas conforme descrito acima. A partir da concentração sérica de triglicerídeos, foram calculadas as concentrações de VLDL (Lipoproteínas de muito baixa densidade – *Very low density lipoproteins*), utilizando o seguinte cálculo: $VLDL\ (mg/dL) = Triglicerídeos\ (mg/dL)/5$. A partir da concentração de HDL e VLDL, foi calculada a concentração de LDL (Lipoproteínas de baixa densidade – *Low density lipoproteins*), utilizando o cálculo: $LDL\ (mg/dL) = HDL + VLDL$.

Determinação das concentrações de glicose e insulina plasmática

A determinação da concentração de glicose (em mg/dL) foi realizada antes (1ª semana) e durante (9ª semana) a indução da obesidade. Os animais permaneceram em privação alimentar durante 6 horas e o sangue foi retirado após corte na ponta da cauda e colocado em fitas individuais específicas para leitura no glicosímetro (Accu-Check Active, Roche Alemanha). Ao final da indução da obesidade, as concentrações séricas de glicose foram novamente determinadas em alíquotas de soro, pelo método enzimático colorimétrico glicose-oxidase (Doles®). A concentração plasmática de insulina no soro (em ng/mL) foi determinada por método de radioimunoensaio (Insulin Kit).

Avaliação da sensibilidade à insulina pelo Índice de HOMA-IR

A sensibilidade à insulina foi avaliada ao final da 18ª semana de indução da obesidade, utilizando-se o índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*) (Matthews et al., 1985), que leva em consideração a insulina e a glicemia de jejum, através da seguinte fórmula matemática: $\text{HOMA-IR} = \text{insulina em jejum} \times \text{glicemia em jejum} / 22,5$.

Teste oral de tolerância à glicose

A realização do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) baseou-se em estudos anteriores do nosso grupo (Silva et al., 2015). No final da 18ª semana de indução da obesidade, após 6 horas de privação alimentar, a glicemia de cada animal foi verificada por glicosímetro portátil (Accu-Check Active, Roche Alemanha), caracterizando a glicemia do tempo zero. Em seguida, glicose na dose de 2 g/kg foi administrada aos camundongos por gavagem. A partir desse momento, o cronômetro foi acionado e novas determinações da glicemia foram feitas nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Estudo da reatividade vascular em anéis de aorta isolada

Após anestesia com isoflurano, as aortas torácicas foram removidas e colocadas em uma placa de petri contendo solução nutriente de Krebs-Henseleit modificada a 4°C, com a seguinte composição (em mM): NaCl, 113; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,1; MgSO₄, 1,1; NaHCO₃, 25; NaNa EDTA, 0,03; CaCl₂, 2,5; Dextrose, 5,5 (Carvalho et al., 1987). A porção mediana da aorta torácica foi dividida em 4 anéis de 2 mm de comprimento, sendo que em dois deles o PVAT foi mantido e nos outros dois o PVAT foi mecanicamente removido. Os anéis com e sem endotélio, na presença ou ausência de PVAT foram montados em miógrafo (modelo 620M; Danish Myo Technology – DMT, Copenhagen, Denmark) para estudo da geração de força isométrica, conectado a um transdutor de sinal (ML T001 transdutor isométrico de tensão, Power Lab/8S, ADInstruments Pty Ltda, Australia) acoplado a um computador. As cubas do miógrafo continham solução de Krebs-Henseleit modificada, gaseificada com 95%

de O₂ e 5% de CO₂, e aquecida à 37° C. As preparações permaneceram sob tensão de 5 mN por 30 minutos para estabilização, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 10 minutos.

Após o período de estabilização, as artérias foram contraídas com a administração de cloreto de potássio (KCl 120 mM), com a finalidade de se avaliar a integridade funcional. Após um período de lavagem e estabilização por mais 30 minutos, a eficiência na remoção do endotélio foi testada por meio da avaliação do relaxamento à ACh (vasodilatador dependente de endotélio, concentração 10⁻⁶ M) em vasos pré-contraídos com FE (concentração 10⁻⁶ M). A ausência de relaxamento à ACh ou a presença de relaxamento de até 5% do valor da pré-contracção, em anéis de aorta previamente submetidos à remoção mecânica do endotélio, foi dada como prova da retirada do endotélio (Lobato et al., 2012).

Curvas concentração-efeito para FE (10⁻¹⁰ – 10⁻⁴ M) foram realizadas em anéis de aorta na presença e na ausência de PVAT. A participação das EROs nos efeitos promovidos pelo PVAT foi investigada utilizando os seguintes inibidores: 4,5-dihidroxi- ácido 1,3-benzenodisulfônico dissódico monohidratado (Tiron, sequestrador seletivo de O₂⁻, 10⁻⁴ M, 30 minutos), MnTMPyP (mimético da SOD-Mn, dismutador de ânion superóxido, 3x10⁻⁵ M, 30 minutos), Peg-catalase (enzima que degrada H₂O₂, 150 U/mL, 30 minutos). A participação das EROs mitocondriais nas alterações das respostas ao agonista contrátil foi avaliada utilizando o composto carbonil cianida 3-clorofenil-hidrazona (CCCP, desacoplador da fosforilação oxidativa mitocondrial, 10⁻⁶ M, 40 minutos). Os mecanismos envolvidos nos efeitos contráteis e relaxantes mediados por EROs (O₂⁻ e H₂O₂) foram avaliados por intermédio da incubação com o inibidor da via da Rho cinase, Y27632 (10⁻⁴ M, 30 minutos). Adicionalmente, foram realizadas curvas concentração-efeito para o inibidor da via da Rho cinase Y27632 (3x10⁻¹⁰ à 3x10⁻⁵ M) em vasos contraídos previamente com FE. A resposta vasoconstritora induzida pela FE foi expressa pelos valores de contracção em mN e a vasodilatação induzida pelo Y27632 como porcentagem em relação à pré-contracção com FE. Todas as drogas utilizadas foram dissolvidas em Krebs Henseleit ou dimetilsulfóxido (DMSO).

Quantificação protéica por Western Blotting no PVAT

Extrato total

O PVAT retirado dos segmentos de aorta dos dois grupos experimentais foi isolado, congelado em nitrogênio líquido, pulverizado e homogeneizado em tampão de lise gelado (coquetel inibidor de proteases ([4-{2-aminoetil} fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina]; Sigma Aldrich) acrescido de ortovanadato de sódio (10^{-3} M), PMSF (fluoreto de fenilmetil-sulfonil, 10^{-3} M) e coquetel inibidor de protease (1%). Os extratos teciduais foram centrifugados a 13000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, foi quantificado o conteúdo proteico total, pelo método de Bradford. As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditioneitol (DTT, 200 mM) e 70 µg de proteína total foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS PAGE) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel havia um marcador com peso molecular de valores estabelecidos.

“Immunoblotting”

A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente por 2 horas a 100 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (albumina do soro bovino 5% - *bovine serum albumin*) a temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas individualmente com anticorpos, os quais estão descritos na Tabela 2. Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora TBS 1% BSA (solução salina tamponada com Tris - *tris-buffered saline*), por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução tampão TBS-T (*tris-buffered saline and tween*) por 30 minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 hora, em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência, como descrito no protocolo do kit. A emissão de luz foi detectada e visualizada em auto-radiografias. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).

Tabela 2. Lista de anticorpos primários.

Anticorpo Primário	Diluição	Marca/Catálogo	Gel
β-actina	1:3000	Cell Signaling / 4967L	--
Catalase	1:1000	Cell Signaling / 8841	12%
Mn/SOD	1:1000	Millipore / 06-984	12%
CuZn/SOD	1:1000	ABCCAM / ab13498	12%
Complexo I mitocondrial	1:1000	ABCCAM / ab110245	15%
Complexo III mitocondrial	1:500	ABCCAM / ab96333	15%
UCP-1	1:1000	ABCCAM / ab23841	12%
MYPT total	1:400	Cell Signaling / 2634	8%
MYPT fosforilada	1:400	Cell Signaling / 4563	8%
VDAC	1:1000	Cell Signaling / 4866	10%

Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT – Dihidroetidina

A geração de EROs foi determinada utilizando um método qualitativo que envolve a dihidroetidina (DHE), um precursor não fluorescente do brometo de etídio, conforme previamente descrito por Suzuki e colaboradores (1995). Na presença de EROs, a hidroetidina é oxidada dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (E) e 2-hidróxi etídeo (EHO), que têm afinidade pelo DNA nuclear.

Os segmentos de aorta isolada sem endotélio, na presença de PVAT, foram rapidamente imersos em meio de congelamento. Utilizando-se um criostato (Leica, Alemanha), cortes transversais de aorta (20 µm) foram obtidos e colocados em lâminas silanizadas. Os cortes foram incubados com 20 µL de dihidroetidina 2,5 µM (30 minutos, a 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz. Após este período, as lâminas foram observadas em microscópio óptico (ZEISS) equipado com filtro para rodamina e câmera fotográfica, utilizando uma objetiva para fluorescência com aumento de 200X. A localização da geração de EROs foi realizada visualmente em três áreas diferentes de cada corte do PVAT, onde foram observados núcleos marcados com fluorescência vermelha proveniente dos produtos de oxidação da DHE. A geração das EROs foi quantificada através da densidade luminosa corrigida pela área utilizando o programa ImageJ.

Respiração e medidas da produção de peróxido de hidrogênio mitocondriais

O PVAT foi retirado e permeabilizado em solução BIOPS (2,77 mM EGTA; 20 mM imidazol; 20 mM taurina; 50 mM ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico de potássio; 0,5 mM DTT; 6,56 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 15 mM fosfocreatina; 0,577 mM ATP; pH 7,1) acrescido de saponina (0,04 mg/mL) durante 15 minutos. Em seguida, o tecido foi lavado em solução de BSA (0,1%) durante 5 minutos sob agitação. A respiração do PVAT (aproximadamente 2 mg/mL) foi monitorada em 2 mL de meio MIR05 [(0,5 mM EGTA; 3 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 60 mM K-lactobionato; 20 mM taurina; 10 mM KH_2PO_4 ; 20 mM HEPES; 110 mM Sacarose; 1g/L albumina, pH 7,1) acrescido de substratos respiratórios (5,25 mM succinato; 4,5 mM piruvato; 2,5 mM malato e 2,5 mM glutamato)] através de oxígrafo (OROBOROS Oxygraph® Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria).

Alíquotas de 20 μL do meio de reação foram retiradas para quantificação do H_2O_2 produzido, utilizando o kit Amplex Red (8 μM) e HRP (4 U/mL) (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) (Zhou et al., 1997). A fluorescência emitida foi medida nos comprimentos de excitação: 530 nm e emissão: 590 nm por meio de fluorímetro de placa (Synergy™ 2 Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments). O resultado foi expresso como média $\pm$ E.P.M. da intensidade de fluorescência detectada no PVAT (Unidades Arbitrárias), corrigida pela quantidade de proteínas totais no tecido.

Análise estatística

As curvas concentração-efeito individuais à FE foram plotadas em uma curva sigmoidal pela análise de regressão não linear. Estas curvas, por sua vez, fornecem a pD_2 (definida como o logaritmo negativo dos valores de EC_{50} – concentração que produz 50% da resposta máxima) e a resposta máxima ($Em_{\text{máx}}$). Os valores de pD_2 e de resposta máxima foram comparados por meio da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni. Outras análises foram feitas utilizando o teste t de Student. O programa Prisma, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) foi utilizado para analisar estes parâmetros, bem como para a construção das curvas sigmóides e demais gráficos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. O nível de significância mínima determinado foi $p < 0,05$.

Resultados

Evolução ponderal dos animais mantidos em dieta controle e dieta hiperlipídica

A massa corporal nas primeiras semanas de dieta foi semelhante entre os grupos. No entanto, a partir da 5ª semana, os animais mantidos em dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de massa corporal em relação aos animais mantidos em dieta controle (Fig. 3).

Figura 3 – Ganho de massa corporal dos animais mantidos em dieta controle e animais mantidos em dieta hiperlipídica. Cada ponto representa a média semanal $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. dieta controle ($n=16$ para cada grupo experimental).

Perfil nutricional e caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica

A tabela 3 mostra o perfil nutricional dos animais mantidos em dieta controle e em dieta hiperlipídica. A dieta hiperlipídica tornou os animais obesos, de acordo com avaliação do índice de adiposidade. Os demais parâmetros do perfil nutricional, como massa corporal final, ingestão calórica, eficiência alimentar, ganho de massa, depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral e gordura corporal total, foram também maiores nos animais mantidos em dieta hiperlipídica quando comparados ao grupo controle. Entretanto, a ingestão alimentar foi menor nos animais mantidos em dieta hiperlipídica.

Tabela 3 – Perfil nutricional e caracterização da obesidade

	Animais mantidos em dieta CONTROLE	Animais mantidos em dieta HIPERLIPÍDICA
Massa corporal inicial (g)	21,2 ± 0,3	21,3 ± 0,2
Massa corporal final (g)	29,9 ± 0,4	41,7 ± 0,9*
Ingestão alimentar (g/semana)	19,4 ± 0,1	16,7 ± 0,2*
Ingestão calórica (kcal/semana)	73,8 ± 0,4	90,4 ± 0,9*
Ganho de massa (g)	4,5 ± 0,2	12,9 ± 1,0*
Eficiência alimentar (g/kcal) x 100	0,3 ± 0,02	0,8 ± 0,06*
Gordura epididimal (g)	0,52 ± 0,02	2,43 ± 0,08*
Gordura visceral (g)	0,13 ± 0,02	0,82 ± 0,04*
Gordura retroperitoneal (g)	0,16 ± 0,03	0,97 ± 0,02*
Gordura total	0,81 ± 0,07	4,22 ± 0,14*
Índice de adiposidade (%)	2,17 ± 0,1	10,32 ± 0,5*

Dados expressos em média ± E.P.M. *, p<0,05 vs. animais mantidos em dieta controle (n=10-15 para cada grupo experimental).

Perfil lipídico

Conforme descrito na tabela 4, os animais mantidos em dieta hiperlipídica apresentaram aumento nas concentrações séricas de todos os parâmetros do perfil lipídico, quando comparados aos animais mantidos em dieta controle.

Tabela 4 – Perfil lipídico dos animais mantidos em dieta controle e hiperlipídica

	Animais mantidos em dieta CONTROLE	Animais mantidos em dieta HIPERLIPÍDICA
Colesterol total (mg/dL)	81,6 ± 3,5	125,8 ± 6,6 [*]
Triglicérides (mg/dL)	67,1 ± 5,4	106,3 ± 12,1 [*]
HDL-colesterol (mg/dL)	51,6 ± 1,6	70,0 ± 2,9 [*]
LDL-colesterol (mg/dL)	18,3 ± 1,6	33,3 ± 2,6 [*]
VLDL-colesterol (mg/dL)	13,3 ± 1,0	21,3 ± 2,4 [*]

Dados expressos em média ± E.P.M. *, p<0,05 vs. animais mantidos em dieta controle (n=6-7 para cada grupo experimental).

Determinação das concentrações de glicose e insulina e avaliação da sensibilidade à insulina

A glicemia de jejum, avaliada nas amostras de sangue capilar ao final da 9ª semana e da 18ª semana, foi significativamente maior nos animais do grupo obeso quando comparada àquela nos respectivos grupos controles (Fig. 4A). Do mesmo modo, a glicemia em jejum, avaliada no plasma obtido do sangue venoso, foi maior nos animais do grupo obeso após 16 semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, quando comparada à glicemia em animais do grupo controle (Fig. 4B). Por outro lado, não houve diferença nas concentrações de insulina no soro (Fig. 4C), bem como no índice HOMA-IR (Fig. 4D) entre animais controles e obesos.

Figura 4 – Concentrações de glicose e insulina e avaliação da sensibilidade à insulina. Glicemia de jejum ao longo do tratamento com as dietas controle e hiperlipídica (A). Níveis plasmáticos de glicose (B), insulina (C) e índice HOMA-IR (D) após 18 semanas de dieta. Cada ponto representa a média ± E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. controle ($n=6$ para cada grupo experimental).

Avaliação da tolerância à glicose

No teste oral de tolerância à glicose (Fig. 5A), a glicemia basal T0 (antes da administração oral de glicose) foi significativamente maior no grupo obeso quando comparada à do grupo controle. O pico máximo de glicemia ocorreu após 15 minutos da sobrecarga de glicose, com um declínio nas concentrações sanguíneas após este tempo (T30). A área sob a curva da concentração de glicose sanguínea se mostrou diferente entre os grupos, com aumento significativo nos animais obesos (Fig. 5B).

Figura 5 – Avaliação da tolerância à glicose. Curvas glicêmicas (A) e área sob a curva (B), obtidas no teste oral de tolerância à glicose dos grupos controle e obeso. Os pontos e barras representam a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. controle ($n=6$ para cada grupo experimental).

Efeito da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a resposta contrátil à FE

Na avaliação de reatividade vascular, a FE induziu resposta contrátil dependente de concentração, que foi maior nos anéis de aorta de camundongos obesos, quando comparada àquela no grupo controle, tanto na presença (Fig. 6A e 6C) quanto na ausência do endotélio (Fig. 6B e 6D). A tabela 5 mostra os efeitos da obesidade sobre os valores de pD_2 da FE em aortas de camundongos controles e obesos.

Figura 6 – A obesidade induzida por dieta hiperlipídica promove disfunção vascular. As figuras mostram curvas concentração-efeito e os valores de Emáx para FE em aortas de camundongos controles e obesos com (A e C) e sem (B e D) endotélio. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. respectivo controle ($n=6$ para cada grupo experimental).

Tabela 5 – Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos na presença (+) e na ausência (-) de endotélio.

Grupos	pD_2	
	Endotélio (+)	Endotélio (-)
Controle	6,27 $\pm$ 0,05 (n=6)	6,56 $\pm$ 0,05 (n=6)
Obeso	7,14 $\pm$ 0,05 (n=5)*	7,11 $\pm$ 0,06 (n=6)*

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. respectivo controle.

Efeito da obesidade sobre a ação anticontrátil do PVAT

Nos animais controles, os anéis circundados pelo PVAT mostraram diminuição na resposta contrátil à FE, seja na presença (Fig. 7A e 7C) ou na ausência (Fig. 7B e 7D) de endotélio. No entanto, nos anéis de aorta dos animais obesos, a contração à FE não foi afetada pela presença do PVAT, tanto na presença (Fig. 7E e 7G) quanto na ausência (Fig. 7F e 7H) de endotélio, indicando que a obesidade compromete a ação anticontrátil do PVAT. A tabela 6 mostra os efeitos do PVAT sobre os valores de pD_2 da FE em aortas de camundongos controles e obesos.

Figura 7 – A obesidade compromete a ação anticontrátil do PVAT. As figuras mostram curvas concentração-efeito e os valores de Emax para FE em aortas de camundongos controles e obesos, com (A, C, E e G) e sem (B, D, F e H) endotélio, na presença ou na ausência do PVAT. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. ao respectivo controle PVAT (-) ($n = 5-6$ para cada grupo experimental).

Tabela 6 – Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos, circundados ou não por PVAT, na presença (+) e na ausência (-) de endotélio.

Grupos	pD_2	
	Endotélio (+)	Endotélio (-)
Controle PVAT (-)	6,27 $\pm$ 0,05 (n=6)	6,56 $\pm$ 0,05 (n=6)
Controle PVAT (+)	5,96 $\pm$ 0,07 (n=6) *	6,29 $\pm$ 0,07 (n=6) *
Obeso PVAT (-)	7,19 $\pm$ 0,05 (n=5)	7,16 $\pm$ 0,06 (n=6)
Obeso PVAT (+)	7,08 $\pm$ 0,05 (n=6)	7,32 $\pm$ 0,09 (n=6)

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. ao respectivo controle PVAT (-).

Considerando que a remoção do endotélio não afetou a modulação pelo PVAT das respostas contráteis dos animais controles e obesos, os próximos resultados apresentados referem-se a experimentos em que o endotélio foi removido, a fim de excluir as possíveis modulações exercidas por estas células e esclarecer de maneira mais objetiva a participação do PVAT na reatividade vascular.

Efeito da obesidade sobre a geração de EROs no PVAT

A geração de EROs, analisada pela intensidade de fluorescência da DHE, foi significativamente maior no PVAT de animais obesos quando comparada àquela no PVAT de animais controles (Fig. 8).

Figura 8 – A obesidade induz aumento da geração de EROs no PVAT. Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio, determinada pela fluorescência da dihidroetidina, no PVAT de grupos controles e obesos. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de intensidade de fluorescência (n=5 para cada grupo experimental).

Participação das EROs sobre os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT

Para verificar se as EROs contribuem para o comprometimento da ação anticontrátil do PVAT nos animais obesos, adicionamos um sequestrador de $O_2^{\cdot -}$, Tiron (10^{-4} M, 30 min). Observamos que no grupo controle (Fig. 9A e 9C), o Tiron promoveu redução da resposta máxima nos vasos sem PVAT. Todavia, nos vasos com PVAT observamos aumento na resposta máxima do agonista contrátil, indicando que as EROs produzidas tanto no músculo liso, quanto no PVAT, participam na modulação do tônus vascular.

No grupo obeso (Fig. 9B e 9D), a incubação com Tiron aumentou a contração dos anéis sem PVAT enquanto, curiosamente, nos anéis circundados pelo PVAT houve diminuição significativa na contração à FE, sugerindo que na obesidade ocorre aumento significativo de radicais livres que contribuem para a perda do efeito anticontrátil do PVAT. A tabela 7 mostra os efeitos do Tiron sobre os valores de pD_2 da FE em aortas circundadas ou não pelo PVAT de camundongos controles e obesos.

Figura 9 – EROs modulam os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT. As figuras mostram curvas concentração-efeito e os valores de Emáx para FE em aortas de camundongos controles (A e C) e obesos (B e D), na presença de Tiron ou veículo e na presença ou na ausência do PVAT. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (-); #, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); &, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+) ($n = 5-6$ para cada grupo experimental).

Tabela 7 – Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com Tiron ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT.

Grupos	pD_2	
	Controle	Obeso
PVAT (-)	$6,57 \pm 0,05$ (n=6)	$7,11 \pm 0,06$ (n=6)
PVAT (-)_Tiron	$7,59 \pm 0,08$ (n=5) [*]	$7,45 \pm 0,04$ (n=6) [#]
PVAT (+)	$6,29 \pm 0,07$ (n=6)	$7,33 \pm 0,08$ (n=6)
PVAT (+)_Tiron	$6,43 \pm 0,05$ (n=6)	$6,65 \pm 0,06$ (n=6) ^{&}

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (-); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (-); &, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+).

Efeito do desacoplamento mitocondrial sobre a perda do efeito anticontrátil do PVAT

Para verificar a participação das EROs mitocondriais nos efeitos promovidos pelo PVAT, adicionamos um desacoplador mitocondrial, o CCCP (10^{-6} M, 40 min), que acelera o fluxo de elétrons na cadeia respiratória e reduz a geração de EROs. No grupo controle (Fig. 10A e 10C), observamos que o CCCP aumentou a potência da FE em vasos sem PVAT, enquanto nos vasos circundados por PVAT houve aumento significativo nos níveis contráteis. Estes resultados mostram que as EROs mitocondriais participam no controle basal do tônus vascular e do efeito anticontrátil promovido pelo PVAT.

No grupo de animais obesos (Fig. 10B e 10D), o CCCP corrigiu o comprometimento da ação anticontrátil do PVAT, indicando que o aumento de EROs mitocondriais está envolvido na perda do efeito anticontrátil do PVAT. No entanto, o CCCP não alterou a contração nos vasos sem PVAT, o que demonstra que a mitocôndria presente exclusivamente no PVAT participa na modulação da resposta contrátil na obesidade. A tabela 8 mostra os efeitos do CCCP sobre os valores de pD_2 da FE em aortas circundadas ou não pelo PVAT de camundongos controles e obesos.

Figura 10 – EROs mitocondriais modulam os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT. As figuras mostram curvas concentração-efeito e os valores de Emáx para FE em aortas de camundongos controles (A e C) e obesos (B e D), na presença de CCCP ou veículo e na presença ou na ausência do PVAT. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+) ($n = 5-6$ para cada grupo experimental).

Tabela 8 – Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos, incubados com CCCP ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT.

Grupos	pD_2	
	Controle	Obeso
PVAT (-)	$6,59 \pm 0,06$ (n=6)	$7,13 \pm 0,06$ (n=6)
PVAT (-)_CCCP	$7,09 \pm 0,05$ (n=6)*	$7,27 \pm 0,05$ (n=6)
PVAT (+)	$6,31 \pm 0,05$ (n=6)	$7,35 \pm 0,07$ (n=6)
PVAT (+)_CCCP	$7,36 \pm 0,04$ (n=5) [#]	$6,76 \pm 0,08$ (n=6) ^{&}

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (-); #, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); &, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+).

Participação do ânion superóxido mitocondrial na perda do efeito anticontrátil do PVAT

Nossos próximos experimentos visaram elucidar qual possível ERO gerada a partir da respiração mitocondrial está envolvida na regulação da reatividade vascular nos animais obesos. A fim de avaliar a participação do $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial nos efeitos promovidos pelo PVAT, adicionamos um antioxidante mitocondrial que dismuta o $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 , o MnTMPyP (3×10^{-5} M, 30 min). Nos anéis do grupo controle (Fig. 11A e 11C), observamos que o MnTMPyP diminuiu a resposta contrátil à FE apenas na presença do PVAT, indicando que o $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial media a regulação da contração vascular exercida por este tecido.

No grupo obeso, a presença do MnTMPyP promoveu redução da contração vascular nos anéis de aorta que não apresentavam PVAT (Fig. 11B e 11D), tornando a resposta destes vasos similar àquela observada no grupo controle. Estes achados sugerem que o MLV constitui uma fonte potencial de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial que participa do aumento da contratilidade vascular observada no grupo obeso. Nos anéis de aorta com PVAT, o MnTMPyP promoveu aumento significativo da resposta à FE, sugerindo que o $O_2^{\cdot -}$ gerado na mitocôndria do PVAT também é um importante sinalizador para o controle da contração vascular. A tabela 9 mostra os efeitos do MnTMPyP sobre os valores de pD_2 da FE em aortas de camundongos controles e obesos, circundadas ou não pelo PVAT.

Figura 11 – O ânion superóxido mitocondrial modula os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT. As figuras mostram curvas concentração-efeito e os valores de Emáx para FE em aortas de camundongos controles (A e C) e obesos (B e D), na presença de MnTMPyP ou veículo e na presença ou na ausência do PVAT. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (-); &, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+) ($n = 5-6$ para cada grupo experimental).

Tabela 9 – Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos, incubados com MnTMPyP ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT.

Grupos	pD_2	
	Controle	Obeso
PVAT (-)	6,52 ± 0,05 (n=6)	7,09 ± 0,05 (n=6)
PVAT (-)_MnTMPyP	6,53 ± 0,04 (n=6)	6,98 ± 0,05 (n=5)
PVAT (+)	6,29 ± 0,07 (n=6)	7,33 ± 0,09 (n=6)
PVAT (+)_MnTMPyP	7,18 ± 0,05 (n=6)	7,49 ± 0,05 (n=6)

Os dados representam a média ± E.P.M. dos valores de contração.

Participação do peróxido de hidrogênio na perda do efeito anticontrátil do PVAT

No intuito de investigar a participação do H_2O_2 nos efeitos promovidos pelo PVAT, adicionamos nas preparações de anéis isolados, um antioxidante que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 , a Peg-catalase (200 U/mL, 30 min). Nos anéis de aorta do grupo controle (Fig. 12A e 12C), na ausência de PVAT, a incubação com Peg-catalase não alterou valores de contração, indicando que o H_2O_2 gerado no MLV tem pouca importância na reatividade vascular a este agonista. No entanto, na presença do PVAT, a incubação com Peg-catalase aumentou a contração para FE, mostrando que de fato, o H_2O_2 gerado no PVAT é um PVRF.

Surpreendentemente, nos anéis de aorta do grupo obeso (Fig.12B e 12D), a Peg-catalase diminuiu a resposta contrátil à FE tanto nos anéis sem PVAT, quanto naqueles circundados com PVAT, indicando que o H_2O_2 produzido tanto no MLV quanto no PVAT estão envolvidos no aumento da resposta contrátil da aorta na obesidade. A tabela 10 mostra os efeitos da Peg-catalase sobre os valores de pD_2 da FE em aortas de camundongos controles e obesos, circundadas ou não pelo PVAT.

Figura 12 – O peróxido de hidrogênio modula os efeitos vasculares exercidos pelo PVAT. As figuras mostram curvas concentração-efeito e os valores de Emáx para FE em aortas de camundongos controles (A e C) e obesos (B e D), na presença de Peg-catalase ou veículo e na presença ou na ausência do PVAT. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (-) ($n = 5-6$ para cada grupo experimental).

Tabela 10 – Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos, incubados com Peg-catalase ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT.

Grupos	pD_2	
	Controle	Obeso
PVAT (-)	$6,57 \pm 0,04$ (n=6)	$7,11 \pm 0,06$ (n=6)
PVAT (-)_Peg-catalase	$6,58 \pm 0,07$ (n=6)	$7,56 \pm 0,04$ (n=5) [#]
PVAT (+)	$6,29 \pm 0,07$ (n=6)	$7,33 \pm 0,08$ (n=6)
PVAT (+)_Peg-catalase	$6,68 \pm 0,07$ (n=6) [*]	$6,45 \pm 0,07$ (n=5) ^{&}

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (-); &, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+).

Até o momento, os resultados apresentados demonstram que o desacoplamento mitocondrial, utilizando o CCCP, bem como a redução dos níveis de H_2O_2 , utilizando a Peg-catalase, corrigem a perda da ação anticontrátil do PVAT observada nos animais obesos. Em conjunto, estes dados indicam que as EROs geradas a partir do metabolismo mitocondrial, principalmente o H_2O_2 , estão envolvidas no controle da reatividade vascular mediado pelo PVAT, bem como nas alterações observadas na obesidade.

Efeito da obesidade sobre a respiração basal da mitocôndria no PVAT

Nosso próximo experimento visou compreender se a disfunção mitocondrial predispõe ao aumento de EROs na obesidade. Para avaliar a função mitocondrial, utilizamos o PVAT de aorta torácica e medimos a taxa de respiração celular utilizando um eletrodo tipo Clark ligado a um oxígrafo. O PVAT foi estimulado com substratos para o ciclo de Krebs e diretamente para os complexos respiratórios, tais como succinato, piruvato, malato e glutamato. Após curto período de estabilização, adicionamos concentrações crescentes de CCCP. A Figura 13 ilustra os procedimentos e os resultados obtidos, de modo que nos permitiu avaliar os parâmetros respiratórios através da concentração e do fluxo de O_2 .

Figura 13 – Esquema representativo da respiração do PVAT da aorta torácica de camundongos.

O PVAT da aorta torácica dos animais obesos apresentou diminuição significativa da velocidade de respiração basal (após adição de substratos) quando comparada àquela no PVAT dos animais controles (Fig. 14). Quando adicionamos o CCCP, a permeabilidade da membrana mitocondrial interna à H^+ aumentou, indicando que o potencial eletroquímico de membrana ($\Delta\psi_m$) se dissipou, aumentando o consumo de O_2 para a velocidade máxima da cadeia respiratória mitocondrial. Nesse estado, concentrações crescentes de CCCP aumentaram a velocidade de consumo de O_2 no PVAT de animais controles. Todavia, no PVAT dos animais obesos, observamos que o aumento da respiração ocorreu apenas na última concentração de CCCP. A velocidade de consumo de O_2 no PVAT de animais obesos foi menor, independentemente da concentração de CCCP, que aquela observada no PVAT de animais controles (Fig. 14).

Figura 14 – A obesidade diminui a respiração basal da mitocôndria no PVAT. Consumo de O_2 pelo PVAT da aorta torácica de animais controles e obesos na presença de substratos e concentrações crescentes de CCCP. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de consumo máximo de O_2 . *, $p < 0,05$ vs. respectivo controle; $\neq$, $p < 0,05$ vs. respectivo substrato ($n=5-9$ para cada grupo experimental).

Efeito da obesidade sobre a geração basal de peróxido de hidrogênio mitocondrial no PVAT

A redução na velocidade do consumo de O_2 contribui para a formação de ERO através dos complexos mitocondriais. Na tentativa de corroborar com os nossos dados funcionais de reatividade, que indicaram um possível aumento na geração de EROs mitocondriais e com o lento consumo de O_2 do PVAT de animais obesos, nosso próximo experimento foi destinado a quantificar o H_2O_2 no PVAT. Juntamente com os ensaios de respiração celular, realizamos a medida de H_2O_2 por Amplex Red. O PVAT da aorta torácica dos animais obesos apresentou aumento significativo na produção basal (após adição de substratos) de H_2O_2 quando comparada àquela de animais controles. Como mencionado anteriormente, o CCCP acelera a cadeia respiratória e, conseqüentemente, reduz a produção de EROs. Com aumentos na concentração de CCCP observamos diminuição significativa dos níveis de H_2O_2 tanto do PVAT de animais controles, quanto obesos. O aumento adicional no desacoplamento mitocondrial no PVAT do grupo obeso levou à produção de H_2O_2 aos níveis do controle na ausência do desacoplador (Fig. 15).

Figura 15 – A obesidade aumenta a geração basal de peróxido de hidrogênio mitocondrial no PVAT. Produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial no PVAT da aorta torácica de animais controles e obesos na presença de substratos e concentrações crescentes de CCCP. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. da produção de peróxido de hidrogênio. *, $p < 0,05$ vs. respectivo controle; #, $p < 0,05$ vs. respectivo substrato ($n=5-9$ para cada grupo experimental).

Até o momento nossos resultados evidenciam que na obesidade há aumento na geração de EROs mitocondriais no PVAT e que este aumento está associado à redução da respiração mitocondrial. Portanto, nossos próximos experimentos foram planejados para avaliar a expressão do sistema antioxidante neste tecido.

Efeito da obesidade sobre a expressão proteica da Mn-SOD no PVAT

Para avaliar o efeito da obesidade sobre a expressão proteica da Mn-SOD no PVAT, realizamos ensaios de western blotting no PVAT da aorta torácica de camundongos controles e obesos. Observamos que no PVAT de animais obesos houve diminuição da expressão de Mn-SOD quando comparada àquela no PVAT de animais controles (Fig. 16).

Figura 16 – A obesidade diminui a expressão proteica da Mn-SOD no PVAT. Imagens representativas do western blotting para a proteína Mn-SOD em PVAT de aorta torácica de camundongos controles e obesos. O gráfico mostra a razão da expressão da proteína Mn-SOD pela expressão de β-actina. Os dados representam a média ± E.P.M. dos valores de expressão proteica. *, $p < 0,05$ vs. controle ($n=4-5$ para cada grupo experimental).

Efeito da obesidade sobre a expressão proteica da catalase no PVAT e na aorta torácica

Os ensaios de western blotting no PVAT (Fig. 17A) e na aorta torácica (Fig. 17B) demonstraram que, no PVAT de animais obesos houve aumento da expressão de catalase quando comparada àquela no PVAT de animais controles. No entanto, não observamos diferenças entre os grupos na expressão desta enzima na aorta torácica.

Figura 17 – A obesidade aumenta a expressão proteica da catalase no PVAT. Imagens representativas do western blotting para a proteína catalase no PVAT e na aorta torácica de camundongos controles e obesos. O gráfico mostra a razão da expressão da proteína catalase pela expressão de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de expressão proteica. *, $p < 0,05$ vs. controle ($n=4-5$ para cada grupo experimental).

Efeito da obesidade sobre a expressão da UCP-1 mitocondrial no PVAT

A UCP-1 é capaz de regular o fluxo de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial, consequentemente regulando a geração de EROs. Sendo assim, para avaliar o efeito da obesidade sobre a expressão da UCP-1 mitocondrial, realizamos ensaios de western blotting no PVAT da aorta torácica de camundongos controles e obesos. Observamos que no PVAT de animais obesos houve diminuição da expressão de UCP-1 quando comparada àquela no PVAT de animais controles (Fig. 18).

Figura 18 – A obesidade diminui a expressão proteica de UCP-1 no PVAT. Imagens representativas do western blotting para UCP-1 em PVAT de aorta torácica de camundongos controles e obesos. O gráfico mostra a razão da expressão de UCP-1 pela expressão de β-actina. Os dados representam a média ± E.P.M. dos valores de expressão proteica. *, $p < 0,05$ vs. controle ($n=4$ para cada grupo experimental).

Efeito da obesidade sobre a expressão de proteínas mitocondriais no PVAT

Alterações no número de mitocôndrias podem justificar respostas celulares relacionadas à hipóxia, estresse oxidativo e apoptose. Deste modo, nossos próximos experimentos avaliaram os efeitos da obesidade sobre a expressão de proteínas mitocondriais que permitem inferir alterações quantitativas desta organela. Os ensaios de western blotting no PVAT da aorta torácica de camundongos controles e obesos indicaram que não houve diferença na expressão de proteínas do complexo respiratório (Fig. 19A e 19B), bem como na expressão de canais para ânion voltagem-dependentes (*voltage-dependent anion channel – VDAC*) (Fig. 19C), o que indica um número semelhante de mitocôndrias e complexos respiratórios no PVAT de animais controles e obesos.

Figura 19 – A obesidade não modifica a expressão de proteínas mitocondriais no PVAT. Imagens representativas do western blotting para proteínas dos complexos mitocondriais I (A) e III (B) e para VDAC (C) em PVAT de aorta torácica de camundongos controles e obesos. O gráfico mostra a razão da expressão das proteínas mitocondriais pela expressão de β-actina. Os dados representam a média ± E.P.M. dos valores de expressão proteica (n=4-5 para cada grupo experimental).

De fato, o H_2O_2 é apontado como sendo o mediador da perda do efeito anticontrátil do PVAT nos animais obesos. Sendo assim, relacionamos a disfunção mitocondrial no PVAT da aorta torácica com a possível ativação na via da Rho cinase, uma vez que esta pode ser ativada por aumento na geração de EROs, situação presente no PVAT de animais obesos. Como será observado a seguir, nossos experimentos iniciais mostram o envolvimento do PVAT de animais controles e obesos na modulação da Rho cinase e, posteriormente, indicam o envolvimento direto do H_2O_2 na ativação desta via.

Avaliação do efeito vascular do PVAT na presença de um inibidor da Rho cinase

Avaliamos a participação do PVAT na modulação da via RhoA/Rho cinase através da incubação com inibidor da Rho cinase, o composto Y27632 (10^{-4} M, 30 min). No grupo controle (Fig. 20A e 20C) observamos que o Y27632 diminuiu a resposta contrátil da FE apenas em anéis sem PVAT, mostrando que o PVAT modula negativamente a ativação da via da Rho cinase mediante a contração induzida pela FE.

Diferentemente dos anéis de animais controles, nos anéis dos animais obesos (Fig. 20B e 20D) o Y27632 diminuiu a resposta contrátil da FE tanto em vasos limpos quanto naqueles circundados pelo PVAT, indicando que na obesidade há maior envolvimento da Rho cinase na contração vascular, inclusive na presença do PVAT. A tabela 11 mostra os efeitos do Y27632 sobre os valores de pD_2 da FE em aortas de camundongos controles e obesos, circundadas ou não pelo PVAT.

Figura 20 – A via Rho/RhoA cinase está envolvida nos efeitos vasculares promovidos pelo PVAT na obesidade. As figuras mostram curvas concentração-efeito e os valores de Emáx para FE em aortas de camundongos controles (A e C) e obesos (B e D), na presença de Y27632 ou veículo e na presença ou na ausência do PVAT. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (-); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (-); &, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+) ($n = 6-7$ para cada grupo experimental).

Tabela 11 – Valores de pD_2 da FE em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com Y27632 ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT.

Grupos	pD_2	
	Controle	Obeso
PVAT (-)	6,55 ± 0,05 (n=6)	7,09 ± 0,05 (n=6)
PVAT (-)_Y27632	6,39 ± 0,07 (n=5)	7,02 ± 0,07 (n=5)
PVAT (+)	6,29 ± 0,07 (n=6)	7,33 ± 0,09 (n=6)
PVAT (+)_Y27632	6,51 ± 0,10 (n=6)	6,79 ± 0,07 (n=6)*

Os dados representam a média ± E.P.M. dos valores de contração. *, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+).

Avaliação do efeito vascular do PVAT no relaxamento induzido pelo Y27632

O relaxamento induzido pelo Y27632 nos fornece maiores indícios sobre a atividade da via da RhoA/Rho cinase. Portanto, verificamos a participação do PVAT no relaxamento promovido pelo Y27632. No grupo controle (Fig. 21A e B) observamos que a presença do PVAT diminui a sensibilidade para o Y27632, confirmando o papel modulador que este tecido exerce sobre a ativação da via da RhoA/Rho cinase. Nossos resultados mostram ainda que a obesidade potencializa o relaxamento para o Y27632, o que evidencia maior ativação desta via no MLV nesta condição. A presença do PVAT prejudica tal relaxamento nos animais obesos, o que indica a liberação de fatores que reduzem a atividade desta via. Entretanto, a sensibilidade a este inibidor foi significativamente maior nos vasos com PVAT dos animais obesos do que aquela observada nos animais controles. A tabela 12 mostra os efeitos do PVAT sobre os valores de pD_2 do Y27632 em aortas de camundongos controles e obesos.

Figura 21 – A obesidade favorece o relaxamento induzido pelo Y27632. A figura mostra curvas concentração-efeito (A) e os valores de $E_{m\acute{a}x}$ (B) para Y27632 em aortas de camundongos controles e obesos, na presença ou na ausência do PVAT. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de relaxamento. *, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (-) ($n=6$ para cada grupo experimental).

Tabela 12 – Valores de pD_2 do Y27632 em anéis de aortas de animais controles e obesos, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT.

Grupos	pD_2	
	Controle	Obeso
PVAT (-)	6,30 $\pm$ 0,09 (n=6)	7,19 $\pm$ 0,06 (n=6)
PVAT (+)	5,79 $\pm$ 0,04 (n=6)*	6,97 $\pm$ 0,07 (n=6)

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de relaxamento. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (-).

Participação do peróxido de hidrogênio sobre os efeitos do PVAT na vasodilatação induzida pelo Y27632

Para verificar a participação direta do H_2O_2 nos efeitos promovidos pelo PVAT sobre a vasodilatação induzida pelo Y27632, adicionamos a Peg-catalase (200 U/mL, 30 min). Observamos que a Peg-catalase prejudicou o relaxamento para o Y27632 em anéis controles circundados pelo PVAT (Fig. 22A e 22C).

Nos anéis de animais obesos, na presença ou na ausência do PVAT (Fig. 22B e 22D), a presença da Peg-catalase diminuiu o relaxamento e a sensibilidade, respectivamente, para o Y27632. Nos anéis com PVAT em presença da Peg-catalase, os valores de relaxamento foram similares aos dos anéis controles circundados pelo PVAT. A tabela 13 mostra os efeitos da Peg-catalase sobre os valores de pD_2 do Y27632 em aortas de camundongos controles e obesos.

Figura 22 – O peróxido de hidrogênio está envolvido nos efeitos do PVAT sobre a vasodilatação induzida pelo Y27632. A figura mostra curvas concentração-efeito e os valores de $E_{máx}$ para Y27632 em aortas de camundongos controles (A e C) e obesos (B e D), na presença de Peg-catalase ou veículo e na presença ou na ausência do PVAT. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de relaxamento. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+) ($n=6$ para cada grupo experimental).

Tabela 13 – Valores de pD_2 do Y27632 em anéis de aortas de animais controles e obesos incubados com Peg-catalase ou veículo, na presença (+) e na ausência (-) de PVAT.

Grupos	pD_2	
	Controle	Obeso
PVAT (-)	$6,30 \pm 0,09$ (n=6)	$7,19 \pm 0,06$ (n=6)
PVAT (-)_Peg-cat	$6,46 \pm 0,06$ (n=6)	$6,97 \pm 0,06$ (n=6)
PVAT (+)	$5,73 \pm 0,05$ (n=6)	$6,96 \pm 0,07$ (n=6)
PVAT (+)_Peg-cat	$6,05 \pm 0,05$ (n=6)*	$5,75 \pm 0,04$ (n=6)#

Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. dos valores de relaxamento. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (+); #, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (+).

Quando ativada, a via RhoA/Rho cinase favorece a contração muscular através da inibição da miosina fosfatase. A miosina fosfatase apresenta uma subunidade regulatória, MYPT-1. A fosforilação pela Rho cinase, e consequente inibição da MYPT-1, favorece a sustentação da contração do músculo liso.

Efeito da obesidade e do PVAT sobre a expressão total e fosforilada da MYPT-1 no músculo liso vascular

Para avaliar o efeito da obesidade e do PVAT sobre a expressão proteica e a respectiva fosforilação da MYPT-1, realizamos ensaios de western blotting na aorta torácica de camundongos controles e obesos, incubadas com FE (10^{-6} M, 20 min). Observamos que a obesidade aumenta a expressão total de MYPT-1 (Fig. 23A) e que a presença do PVAT promove aumento significativo na fosforilação da MYPT-1, sendo este aumento corrigido na presença do CCCP (Fig. 23B).

Figura 23 – A presença do PVAT na condição de obesidade promove aumento na fosforilação da MYPT-1 no MLV. Imagens representativas do western blotting para expressão total (A) e fosforilada (B) de MYPT-1 no MLV da aorta torácica de camundongos controles e obesos. Os gráficos mostram a razão da expressão total de MYPT-1 pela expressão de β-actina (A) e a razão da fosforilação pela expressão total de MYPT-1. Os dados representam a média ± E.P.M. dos valores de expressão proteica. *, $p < 0,05$ vs. controle PVAT (-); #, $P < 0,05$ vs. controle PVAT (+); &, $p < 0,05$ vs. obeso PVAT (-) ($n = 4$ para cada grupo experimental).

Discussão

É evidente que o tecido adiposo não participa apenas do controle da homeostasia energética do organismo. Diversos estudos mostram que o tecido adiposo é capaz de produzir e secretar adipocinas e outros fatores que atuam de maneira parácrina ou endócrina, influenciando uma série de processos fisiológicos. A obesidade proporciona diversas modificações estruturais e funcionais dos adipócitos, comprometendo assim a função integradora deste tecido. Os experimentos realizados neste estudo investigaram um dos possíveis mecanismos que comprovam a participação do PVAT que circunda a porção torácica da aorta em alterar a reatividade vascular de animais obesos. O principal achado do nosso estudo foi que a disfunção mitocondrial no tecido adiposo periaórtico de animais obesos culmina no aumento da geração de H_2O_2 por esta organela, e que tal molécula é capaz de afetar a contração do MLV a partir da ativação da via RhoA/Rho cinase.

As dietas hiperlipídicas têm sido amplamente utilizadas em ensaios experimentais de obesidade, mimetizando os efeitos orgânicos associados ao aumento da adiposidade corporal (Carrol et al., 2006). Comumente, o aumento da obesidade em humanos é decorrente de diversas modificações no estilo de vida, atribuídos ao sedentarismo e maus hábitos alimentares, como o aumento no consumo de dietas ricas em gordura e carboidratos (Schrauwen & Westerterp, 2000). Desta maneira, o aumento de aproximadamente 40% no teor de lipídeos na ração dos camundongos provê o aumento de massa corporal e corrobora com o fato de que perturbações originadas por uma alimentação com alto teor de gordura em roedores se assemelham às perturbações metabólicas observadas em humanos (Woods et al., 2003). O aumento da massa corporal associado com o acúmulo de gordura são critérios importantes na caracterização da obesidade. Nosso estudo mostrou que a dieta hiperlipídica aumentou significativamente o índice de adiposidade em relação ao grupo controle e que o maior consumo de gordura e maior ingestão calórica, favorecem o acúmulo de tecido adiposo.

A obesidade é uma condição metabólica em que se observa o aumento nas concentrações séricas e teciduais de ácidos graxos livres, sejam estes esterificados ou não esterificados, proporcionando o acúmulo de lipídeo nos adipócitos e produção de colesterol VLDL no fígado (Ginsberg et al., 2005). Nosso estudo mostrou que os animais mantidos em dieta hiperlipídica apresentaram aumento nas concentrações de triglicerídeos, LDL e VLDL, sugerindo modificações importantes no metabolismo de lipoproteínas, que predispõem riscos de eventos cardiovasculares.

Indivíduos obesos comumente apresentam um conjunto de outras doenças metabólicas, como o diabetes mellitus tipo 2 (DeFronzo & Ferrannini, 1991). Os animais que desenvolveram obesidade ao longo de 18 semanas apresentaram aumento proporcional nos níveis séricos de glicose e intolerância a este carboidrato. Interessantemente, os valores de insulina e do teste que avalia a sensibilidade à insulina, foram semelhantes entre os grupos controle e obeso. De fato, há um estágio intermediário entre os níveis normais de glicose e o diabetes, conhecido como pré-diabetes (ADA – American Diabetes Association, 2011). Neste sentido, o modelo experimental utilizado em nosso estudo não apresenta todas as desordens necessárias para o diagnóstico confirmatório de diabetes mellitus tipo 2. Todavia, não excluimos a influência da hiperglicemia nos resultados apresentados neste estudo.

A disfunção vascular associada à obesidade tem sido amplamente discutida, sendo que o aumento na contração vascular pode ocorrer tanto pela ativação das vias de sinalização envolvidas na contração, quanto por prejuízos relacionados à ativação das vias de relaxamento. Indo ao encontro de trabalhos prévios (Naruse et al., 2006; Chinen et al., 2007; Liu et al., 2015), que mostram os prejuízos no sistema vascular causado pela obesidade, em nosso estudo observamos que a obesidade potencializa a contração vascular, e que tal resposta independe da presença do endotélio, indicando uma possível disfunção no MLV. Camundongos C57BL/6 mantidos com dieta hiperlipídica e ratos obesos Zucker mostram aumentos proporcionais no influxo de Ca^{2+} e na resposta contrátil à angiotensina II, bem como prejuízo no relaxamento dependente de endotélio para acetilcolina na porção torácica da aorta (Nishimatsu et al., 2005; Siddiqui & Hussain, 2006). Mundy e colaboradores (2007) mostraram que em ratos alimentados com dieta rica em gordura, o aumento da contração vascular é decorrente de aumento na expressão de receptores vasoconstritores.

As alterações na função anticontrátil do PVAT na obesidade estão correlacionadas com um desequilíbrio na produção de adipocinas, a presença de inflamação e o estresse oxidativo (Szasz et al., 2013). A sequência destes eventos contrapõe os efeitos protetores deste tecido e conduz a disfunção vascular na obesidade. Os resultados do presente estudo dão suporte aos efeitos diferenciais do PVAT na modulação da contração vascular na obesidade, uma vez que o efeito anticontrátil gerado por este tecido foi perdido nos animais obesos. Nossos achados são consistentes com estudos que encontraram prejuízo na influência vasodilatadora do PVAT em camundongos obesos (Marchesi et al., 2009), além de aumento

nos efeitos contráteis mediados por este tecido em artéria coronária de suínos obesos (Owen et al., 2013). O estudo de Owen e colaboradores demonstrou que a perda do efeito anticontrátil do PVAT em suínos obesos estava associada ao aumento da expressão e atividade de proteínas neste tecido, capazes de sinalizar no músculo liso o aumento na atividade de canais para Ca^{2+} , a redução na atividade de canais para K^{+} e alterações na contração mediada pela Rho cinase. Por outro lado, Agabiti-Rosei e colaboradores (2013) demonstraram em camundongos *ob/ob* redução na produção de adiponectina pelo PVAT e consequente diminuição na abertura de canais para K^{+} ativados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) no músculo liso, prejudicando o relaxamento de artérias mesentéricas. Ratos obesos alimentados com dieta rica em ácidos graxos livres também mostram respostas semelhantes na contração da aorta na presença ou ausência de PVAT. Estes efeitos foram associados com possível redução na liberação de NO pelo endotélio, além do aumento de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo no MLV (Sun et al., 2013).

As evidências descritas acima claramente demonstram a existência de duas vertentes que correlacionam a perda do efeito anticontrátil do PVAT com a obesidade. Estas seriam a diminuição na produção de fatores relaxantes e o aumento na produção de fatores contráteis. Neste sentido, merece destaque o aumento na produção de EROs e/ou distúrbios no funcionamento do sistema antioxidante do tecido adiposo (Styskal et al., 2012). O mecanismo exato que justifica o aumento de radicais livres e o estresse oxidativo em adipócitos de indivíduos obesos não está totalmente elucidado. No entanto, sabe-se que há o envolvimento de vias inflamatórias, aumento de ácidos graxos livres e hiperglicemia (Shoelson et al., 2007; Savini et al., 2013). Neste estudo, comprovadamente mostramos, através da fluorescência da DHE, um aumento significativo de EROs no PVAT da aorta torácica dos animais obesos em relação aos animais controles. É possível inferir que este aumento de EROs constitui um fator crucial na disfunção vascular mediada pelo PVAT, uma vez que a presença do sequestrador de $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Tiron) foi capaz de reduzir a resposta contrátil da aorta de animais obesos na presença do PVAT. Deste modo, é perfeitamente cabível inferir que as EROs geradas no PVAT na condição de obesidade podem influenciar paracrinamente o tônus vascular, ativando vias redox-sensíveis, o que contribui sobremaneira, para a perda do efeito anticontrátil deste tecido.

Em consonância com nossos resultados, Gil-Ortega e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos C57BL/6J suplementados com dieta hiperlipídica durante 32 semanas, apresentam aumento significativo na geração de EROs no PVAT da região mesentérica, e que este aumento está associado com redução na expressão da Cu/Zn-SOD. Bailey-Downs e colaboradores (2013) também demonstraram que camundongos C57BL/6J obesos por dieta hiperlipídica apresentam estresse oxidativo no PVAT que circunda a aorta mediante o aumento na infiltração de macrófagos e na produção de citocinas próinflamatórias.

Como mencionado anteriormente, o PVAT da região torácica da aorta apresenta abundante número de mitocôndrias. O papel da mitocôndria na recepção, na integração e na transmissão de sinais tem emergido recentemente. De fato, esta organela parece participar das respostas celulares a uma variedade de estímulos. Deste modo, torna-se evidente que alterações mitocondriais podem levar a prejuízos em vários aspectos do funcionamento tecidual (Zorov et al., 1997). Em nosso estudo, demonstramos que a mitocôndria contribui para a regulação da reatividade vascular mediada pelo PVAT, por meio da formação de EROs a partir da cadeia respiratória. Utilizamos o CCCP, um agente protonóforo que se ancora na membrana mitocondrial interna e facilita o retorno dos prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial. Desta maneira, o CCCP dissipa o $\Delta\psi_m$ e acelera a velocidade do transporte de elétrons entre os complexos mitocondriais. O aumento deste transporte impede reações de óxido-redução do O_2 com elétrons livres, reduzindo a geração de $O_2^{\cdot -}$ (Hanstein, 1976). Assim como o Tiron, o CCCP potencializou a resposta contrátil para FE nas aortas de animais controles com e sem PVAT, indicando que as EROs do metabolismo mitocondrial, tanto do MLV, quanto do PVAT contribuem para o controle do tônus vascular. No entanto, é evidente que os anéis circundados pelo PVAT detiveram maior amplitude nos valores de contração, enfatizando a importância da mitocôndria presente neste tecido na reatividade vascular.

Recentemente nosso grupo demonstrou que EROs geradas na mitocôndria do PVAT somam-se aos diversos PVRFs, modulando a resposta contrátil da aorta de ratos Wistar (Costa, et al., dados não publicados). Nos animais obesos, interessantemente, a presença do CCCP atenuou a contração da aorta circundada pelo PVAT, indicando que as EROs geradas nesta organela contribuem para perda do efeito anticontrátil do PVAT. Este dado, além de ser inovador na literatura, é de extrema importância para a compreensão da participação das

EROs mitocondriais nos efeitos do PVAT na obesidade. Ketonen e colaboradores (2010) mostram que a geração de EROs via NAD(P)H oxidase contribui para os prejuízos no efeito anticontrátil gerado pelo PVAT. Todavia, a literatura mostra um fenômeno que vêm sendo descrito como *ROS release ROS* (EROs liberando EROs), ou seja, qualquer fonte geradora de EROs pode amplificar a produção por induzir outras fontes a gerar EROs (Zorov et al., 2006; Zorov et al., 2014). De fato, EROs mitocondriais estimulam a translocação da subunidade $p47^{\text{phox}}$ do citoplasma para a membrana, ativando a NAD(P)H oxidase (Dikalov et al., 2012). Sendo assim, a mitocôndria parece constituir uma peça importante no “quebra-cabeça” do estresse oxidativo envolvido na disfunção do PVAT em animais obesos.

A principal ERO produzida pela cadeia respiratória mitocondrial é o $O_2^{\cdot -}$, o qual é convertido a H_2O_2 pela enzima SOD. Gao e colaboradores (2006) mostraram em ratos Wistar-Kyoto, que o estímulo elétrico dos nervos perivasculares induz aumento significativo na geração de $O_2^{\cdot -}$ no PVAT e que este radical livre contribui para ativação da via MAPK/ERK no MLV e consequente aumento da contração de artérias mesentéricas de resistência. Consistente com estes achados, a participação do $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial nos efeitos vasculares promovidos pelo PVAT também foi evidenciada em nosso estudo, uma vez que o composto MnTMPyP, um mimético da Mn-SOD, promoveu redução significativa da contração de segmentos vasculares circundados pelo PVAT de animais controles. Este resultado nos possibilita sugerir dois mecanismos distintos. O primeiro mecanismo cabível é que a remoção do $O_2^{\cdot -}$ pelo MnTMPyP facilitaria o relaxamento, uma vez que esta ERO ao ativar vias contráteis, estaria contrabalanceando os efeitos dos fatores relaxantes produzidos pelo PVAT. Outrora, o segundo mecanismo sugerido se baseia no fato de que o MnTMPyP é responsável pela catálise reacional de $O_2^{\cdot -}$ à H_2O_2 , sendo esta ERO permeável à membranas e podendo potencialmente estimular o relaxamento vascular (Ardanaz & Pagano, 2006).

É digno de nota que o H_2O_2 pode induzir tanto efeito relaxante quanto contrátil, dependendo da concentração de H_2O_2 no MLV. Neste sentido, o estudo de Gil-Longo e González-Vásquez (2005) mostra que concentrações crescentes de H_2O_2 , após estímulo pré-contrátil da FE, levam ao aumento do tônus a partir de uma contração transitória, seguida de um relaxamento vascular independente do endotélio. Em nosso estudo, observamos que os anéis de animais obesos, circundados pelo PVAT, detiveram aumento da contração na presença do MnTMPyP, o que nos permite sugerir que na obesidade há aumento na geração

de $O_2^{\cdot -}$ pela mitocôndria e que este radical livre está sendo amplamente eliminado em forma de H_2O_2 que, por sua vez, promove aumento da contração do MLV. Reforçando esta hipótese, observamos que os anéis de aorta dos animais obesos, incubados com Peg-catalase, na presença e na ausência do PVAT, apresentaram diminuição na contração à FE. Estes resultados evidenciam o papel do H_2O_2 na hipercontratilidade do MLV e na perda do efeito anticontrátil do PVAT. Outros estudos corroboram nossos dados, mostrando que em condições fisiopatológicas, como a hipertensão arterial, o H_2O_2 induz contração intermitente do MLV e que este efeito só é abolido na presença da Peg-catalase (Silva et al., 2013; García-Redondo et al., 2015).

De maneira interessante, observamos que nos animais controles, a Peg-catalase favoreceu aumento na contração daqueles anéis circundados pelo PVAT, mostrando que o H_2O_2 gerado no PVAT de animais controles se constitui de um PVRF. Este dado corrobora os achados de Gao e colaboradores (2007), demonstrando que o PVAT da aorta torácica de ratos Wistar produz e libera H_2O_2 , culminando no relaxamento vascular mediante ativação da sGC, além de reforçar as evidências que indicam efeitos diferenciais do PVAT na modulação da contração vascular na obesidade.

Com base nas observações de que o desacoplamento mitocondrial e a remoção do H_2O_2 corrigem a perda do efeito anticontrátil do PVAT nos animais obesos, investigamos se o aumento na geração de H_2O_2 no PVAT é dependente da disfunção mitocondrial. A função mitocondrial no PVAT foi avaliada através do consumo de O_2 e consequente taxa de respiração tecidual. Inicialmente, fornecemos substratos para o ciclo de Krebs e diretamente para os complexos respiratórios, no intuito de enriquecer o sistema e prevenir a depleção de ATP. Logo após, adicionamos concentrações crescentes de CCCP a fim de aumentar a respiração tecidual por mecanismos já mencionados anteriormente. Observamos que o PVAT dos animais obesos respira menos que o PVAT de animais controles e que esta redução na velocidade do consumo de oxigênio contribui para a formação de EROs através dos complexos respiratórios. Em suma, mostramos que a taxa de respiração é inversamente proporcional à geração de H_2O_2 no PVAT dos animais obesos. Adicionalmente, e talvez um dos dados mais relevantes deste estudo, o aumento na geração de H_2O_2 no PVAT provém da cadeia respiratória, uma vez que as concentrações crescentes de CCCP corrigem este aumento. Estudos demonstram que mitocôndrias isoladas de adipócitos de pacientes obesos e

não diabéticos apresentam mudanças no potencial de membrana associadas à baixa atividade dos complexos I e III, e que tal condição favorece o estresse oxidativo (Chattopadhyay et al., 2011; Yin et al., 2014). De fato, o estresse oxidativo mitocondrial altera o DNA mitocondrial e a função adequada de proteínas dos complexos da cadeia respiratória, bloqueando parcialmente o fluxo de elétrons e gerando EROs. Desta maneira, a geração descontrolada de EROs mitocondriais desencadeia um ciclo vicioso entre a amplificação na geração destas e nos danos relacionados às estruturas e metabolismo mitocondrial (Paradies et al., 2014).

Os resultados apresentados e discutidos até o momento fortalecem a nossa hipótese de que a obesidade promove disfunção mitocondrial no tecido adiposo periaórtico, aumentando a geração de H_2O_2 neste tecido, o qual se difunde para o MLV, alterando a reatividade vascular.

Alguns mecanismos fisiológicos são capazes de reduzir a geração de EROs mitocondriais. O mecanismo que se destaca no contexto do PVAT semelhante ao TAM é o de desacoplamento, realizado pela UCP-1. Esta proteína reduz o $\Delta\psi_m$ e favorece a redução de EROs. A redução na expressão de UCP-1 observada nos animais obesos utilizados no presente estudo demonstra que de fato ocorre perda do mecanismo que regula negativamente a geração de EROs, o qual facilita o acúmulo dessas espécies reativas que podem promover danos parácrinos à mitocôndria. Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica mostram redução na expressão de UCP-1 em mitocôndrias do TAM submetidas à temperatura constante de 29° - 30° C (Rippe et al., 2000). De fato, o estresse oxidativo mitocondrial tem sido associado à redução na atividade de UCPs em desordens metabólicas como a obesidade e o diabetes mellitus (tipos 1 e 2), doenças cardiovasculares e envelhecimento (Mailloux & Harper, 2011).

Considerando que no PVAT da aorta torácica de animais obesos há disfunção mitocondrial seguida do aumento na geração de EROs, o funcionamento adequado de proteínas do sistema antioxidante é de suma importância para atenuar os danos causados pelo aumento destes radicais livres. Neste estudo, é possível sugerir que as modificações na expressão de enzimas antioxidantes exclusivamente no PVAT de animais obesos, com diminuição na expressão de Mn-SOD e aumento na expressão de catalase, contribuem para o aumento dos níveis de EROs neste tecido. De fato, é essencial para o organismo o equilíbrio entre os agentes oxi-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Em condições patológicas,

como a obesidade, este equilíbrio encontra-se prejudicado, com excesso de agentes oxidantes e deficiência no sistema protetor (Ferreira & Matsubara, 1997). Gil-Ortega e colaboradores (2014) mostraram redução na expressão e na atividade da ec-SOD encontrada no PVAT da região mesentérica de camundongos suplementados com dieta hiperlipídica. Marchesi e colaboradores (2009) mostraram diminuição na expressão de Mn-SOD no PVAT da região mesentérica de camundongos NZO. Embora a maioria dos dados encontrados na literatura mostre que em adipócitos de animais obesos ocorre aumento na expressão de Mn-SOD e expressão inalterada de catalase, nosso estudo é o primeiro a demonstrar os efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica sobre a expressão dessas proteínas antioxidantes no PVAT da aorta de camundongos obesos, de modo independente do MLV.

Diversas síndromes e doenças podem apresentar biogênese mitocondrial, bem como a fissão e fusão desta (Liesa et al., 2009). Ao investigarmos possíveis alterações na quantidade de mitocôndrias e complexos respiratórios no PVAT de animais obesos, não observamos diferença em relação ao controle. Desta maneira, é possível justificar o aumento na produção de EROs mitocondriais não pelo quesito quantitativo, mas de fato, pela função mitocondrial prejudicada na obesidade.

A importância do H_2O_2 como agente de sinalização celular direto, capaz de modular vias contráteis e vias que promovem o crescimento do MLV, tem sido frequentemente demonstrada. Interessante, que a ativação destas vias não depende apenas do H_2O_2 produzido próximo ao alvo final, sendo que existe a possibilidade de efeitos em células distantes do local onde este fator foi produzido (Ardanaz & Pagano, 2006). Há de se entender ainda que o H_2O_2 é uma molécula cuja propriedade redox é dependente do meio em que se encontra, ou seja, a depender do potencial redutor das moléculas do meio, o H_2O_2 pode se comportar como agente oxidante ou redutor (Baker et al., 2000). De maneira geral, EROs são importantes moduladores do tônus vascular, oxidando segundos mensageiros intracelulares, promovendo ativação de múltiplas cascatas de sinalização (Jernigan et al., 2008, García-Redondo et al., 2015). Jin e colaboradores (2004) mostraram que EROs são ativadores diretos da via RhoA/Rho cinase no MLV de aortas de ratos Wistar, confirmando o papel das EROs na vasoconstrição.

A atividade da Rho cinase na obesidade tem sido amplamente discutida. Diversos estudos mostram que a obesidade favorece a atividade da via RhoA/Rho cinase, promovendo

disfunção cardíaca, perda do relaxamento dependente de endotélio, aumento de Ca^{2+} intracelular e consequente hipercontratilidade vascular (Nishimatsu et al., 2004; Naik et al., 2006; Schinzari et al., 2012; Soliman et al., 2015). No presente estudo, propomos que o aumento de EROs mitocondriais no PVAT de animais obesos pode culminar na hiperativação da RhoA/Rho cinase e consequente perda do relaxamento vascular. Neste sentido, nossos resultados de reatividade vascular na presença do inibidor seletivo da Rho cinase, o Y27632, revelaram a importância da via RhoA/Rho cinase na perda do efeito anticontrátil do PVAT na condição de obesidade. De fato, a redução da resposta contrátil provocada pelo Y27632 em vasos de animais obesos circundados pelo PVAT se deve aos fatores produzidos e liberados por este tecido que modulam a contração do MLV mediante ativação da via RhoA/Rho cinase. Em conjunto, nossos dados nos permitem inferir que em animais controles o PVAT regula negativamente a atividade da Rho cinase, contribuindo para a hipocontratilidade da FE, ao passo que na obesidade esta regulação é perdida, somando-se ainda a possibilidade do PVAT produzir fatores que ativam tal via. O presente estudo é o primeiro a demonstrar a participação do PVAT modulando a via RhoA/Rho cinase no MLV.

O relaxamento induzido pelo Y27632 nos forneceu maiores indícios sobre a atividade desta via modulada pelo PVAT. No animal controle a redução da sensibilidade ao Y27632 em vasos circundados pelo PVAT corrobora os dados de contração da FE na presença do inibidor, mostrando pouca ativação desta via nesta condição. No entanto, de maneira interessante, no animal obeso, há uma hiperativação da Rho cinase, uma vez que os efeitos da inibição começam a ser vistos em menores concentrações do inibidor. De fato, em artérias mesentéricas e de condutância de animais hipertensos, se observa maior sensibilidade ao relaxamento induzido pelo Y27632, indicando que nesta condição há envolvimento significativo na contração mediada pela via RhoA/Rho cinase (Weber & Webb, 2001; Asano & Nomura, 2003). De maneira interessante, nossos dados ainda mostram que a presença do PVAT impede a inibição completa desta via, indicando mais uma vez que os fatores produzidos pelo PVAT de animais obesos são moduladores positivos e intermitentes da Rho cinase.

Considerando o fato de que o PVAT de animais obesos é uma fonte potencial de EROs mitocondriais, principalmente de H_2O_2 , os efeitos promovidos pela Peg-catalase, corrigindo ao nível do controle o relaxamento induzido pelo Y27632 em vasos de obesos

circundados pelo PVAT, indicam que de fato o H_2O_2 liberado pelo PVAT na obesidade é um importante ativador da via RhoA/Rho cinase.

Como descrito anteriormente, a via RhoA/Rho cinase promove vasoconstrição mediante a inibição da enzima miosina fosfatase. Esta enzima é responsável por desfosforilar a cadeia leve de miosina e permitir o relaxamento vascular. A miosina fosfatase é regulada pela subunidade MYPT-1 e sua fosforilação (no resíduo de treonina 853) diminui a atividade da enzima (Hilgers & Webb, 2005). Nossos resultados permitiram identificar a MYPT-1 como sendo um componente importante nos efeitos promovidos pela ativação da via RhoA/Rho cinase nos animais obesos, uma vez que, na presença do PVAT, os vasos destes animais apresentaram aumento na fosforilação da MYPT-1. Por fim, observamos que a presença do CCCP impede a fosforilação da MYPT-1 nestas condições, reafirmando a nossa hipótese de que EROs mitocondriais modulam a atividade da RhoA/Rho cinase.

Em resumo, os resultados por nós obtidos enfatizam a importância das EROs mitocondriais na perda dos efeitos promovidos pelo PVAT na condição de obesidade. Estes agentes oxi-redutores se constituem de importantes ativadores de diversas vias contráteis no MLV, como a via RhoA/Rho cinase, demonstrada neste estudo, e possivelmente contribuem ainda para outros mecanismos intracelulares envolvidos na disfunção vascular no modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Sendo assim, este estudo contribui para o entendimento dos mecanismos que controlam a função vascular na obesidade e que sustentam a possibilidade de novos alvos terapêuticos para tal condição.

Conclusão

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que a obesidade está associada com disfunção mitocondrial no PVAT, caracterizada pela diminuição do consumo de oxigênio e aumento na geração de EROs. Adicionalmente, demonstramos que o H_2O_2 se constitui de um importante sinalizador na ativação da via de contração RhoA/Rho cinase no MLV, contribuindo assim para a perda do efeito anticontrátil do PVAT na obesidade.

Referências bibliográficas

AFONSO, F.M.; SICHIERI, R. Body mass index, waist hip ratio and hospitalizations in the city of Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 2, p. 153-163, October, 2002.

AGABITI-ROSEI, C. et al. Anticontractile activity of perivascular fat in obese mice and the effect of long-term treatment with melatonin. **Journal of Hypertension**, v. 32, n. 6, p. 1264-1274, June, 2014.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 562-569, January, 2011.

ARDANAZ, N.; PAGANO, P.J. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 3, p. 237-251, February, 2006.

ARGYROPOULOS, G.; HARPER, M.E. Uncoupling proteins and thermoregulation. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 1, p. 2187-2198, May, 2002.

ASANO, M.; NOMURA, Y. Comparison of inhibitory effects of Y-27632, a Rho kinase inhibitor, in strips of small and large mesenteric arteries from spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. **Hypertension Research**, v. 26, n. 1, p. 97-106, January, 2003.

AUGER, C. et al. Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 25, n. 3, p. 1-11, June, 2015.

BAGI, Z.; FEHER, A.; CASSUTO, J. Microvascular responsiveness in obesity: implications for therapeutic intervention. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 544-560, February, 2012.

BAILEY-DOWNS, L.C. et al. Aging exacerbates obesity-induced oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue in mice: a paracrine mechanism contributing to vascular redox dysregulation and inflammation. **The Journal of Gerontology**, v. 68, n. 7, p. 780-792, July, 2013.

BAKER, C.J. et al. Scavenging of H₂O₂ and production of oxygen by horseradish peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, n. 2, p. 232-237, October, 2000.

BARANDIER, C.; MONTANI, J.; YANG, Z. Mature adipocytes and perivascular adipose tissue stimulate vascular smooth muscle cell proliferation: effects of aging and obesity. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5, p. 1807-1813, November, 2005.

BARTON, M.; BARETELLA, O.; MEYER, M.R. Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 591-602, February, 2012.

BENDER, S.B.; KLABUNDE, R.E. Altered role of smooth muscle endothelin receptors in coronary endothelin-1 and $\alpha 1$ -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in type 2 diabetes. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. 2281-2288, July, 2007.

BIANCO, A.C. Hormônios tireoideos, UCPs e termogênese. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 44, n. 4, p. 281-289, Agosto, 2000.

BLAKE, R.; TROUNCE, I.A. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 4, p. 1404-1412, April, 2014.

BOUTIN, P.; FROQUEL, P. Genetics of human obesity. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 391-404, September, 2001.

CADENAS, E. et al. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinonereductase and ubiquinolcytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 180, n. 2, p. 248-257, April, 1977.

CALLE, E.E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-591, August, 2004.

CARROLL, J.F.; ZENEBE, W.J.; STRANGE, T.B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 65-72, July, 2006.

CARVALHO, M.H.C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76-88, Março, 2001.

CHANG, L. et al. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. **Circulation**, v. 126, n. 9, p. 1067-1078, September, 2012.

CHATTOPADHYAY, M. et al. Mitochondrial bioenergetics is not impaired in nonobese subjects with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 60, n. 12, p. 1702-1710, December, 2011.

CHE, R. et al. Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. **American Journal of Physiology**, v. 306, n. 4, p. 367-378, February, 2014.

CHINEN, I. et al. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 160-165, January, 2007.

CRUNKHORN, S. et al. Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 282, v. 21, p. 15439-15450, May, 2007.

DEFRONZO, R.A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v. 14, n. 3, p. 173-194, March, 1991.

DIKALOV, S.I. et al. Mitochondrial reactive oxygen species and calcium uptake regulate activation of phagocytic NADPH oxidase. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 10, p. 1134-1142, May, 2012.

DULLOO, A.G. et al. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 34, n. 2, p. 4-17, December, 2010.

DUMAS, J. F. et al. Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans? **Diabetes & Metabolism**, v. 35, n. 3, p. 159-167, June, 2009.

ERDOS, B. et al. Cerebrovascular dysfunction in Zucker obese rats is mediated by oxidative stress and protein kinase C. **Diabetes**, v. 53, n. 1, p. 1352-1359, May, 2004.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. **Acta Physiology Scandinavian**, v. 178, n. 1, p. 405-412, February, 2003.

FERNÁNDEZ-ALONSO, M.S. et al. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, n. 1, July, 2013.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, Janeiro, 1997.

FERREIRA, M.; AGUIAR, T.; VILARINHO, L. Cadeia respiratória mitocondrial: aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. **Arquivos de Medicina**, v. 22, n. 2, p. 49-56, Janeiro, 2008.

FÉSÜS, G.; DUBROVSKA, K.; GORZELNIAK, G. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 4, p. 719-727, October, 2007.

FITZGIBBONS, T.P. et al. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 1, p. 1425-1437, July, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 216-229, Abril, 2006.

FRITCH, L. et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 9, p. 1281-1289, November, 2004.

FROMENTY, B. et al. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. **Diabetes & Metabolism**, v. 30, n. 2, p. 121-138, April, 2004.

GAO, Y.J. et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **British Journal of Pharmacology**, n. 151, v. 3, p. 323-331, June, 2007.

GAO, Y.J. et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 1, p. 363-373, March, 2006.

GAO, Y.J. et al. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. **Obesity Research**, v. 13, n. 4, p. 687-692, April, 2005.

GARCÍA-REDONDO, A.B. et al. c-Src, ERK1/2 and Rho kinase mediate hydrogen peroxide-induced vascular contraction in hypertension: role of TXA2, NAD(P)H oxidase and mitochondria. **Journal of Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 77-87, January, 2015.

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

GIL-ORTEGA, M. et al. Changes in resistance artery function during the development of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 54, n. 4, p. 105-106, April, 2009.

GIL-ORTEGA, M. et al. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. **Plos one**, v. 9, n. 4, p. 1-10, April, 2014.

GINSBERG, H.N.; ZHANG, Y.L.; HERNANDEZ-ONO, A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 3, p. 232-240, May, 2005.

GOLLASCH, M.; DUBROVSKA, G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. **Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 12, p. 648-653, December, 2004.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2610-2617, October, 2005.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, August, 1998.

GUZIK, T.J. et al. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 591-610, May, 2007.

HANSTEIN, W.G. Uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 456, n. 1, p. 129-148, February, 1976.

HILGERS, R.H.; WEBB, R.C. Molecular aspects of arterial smooth muscle contraction: focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, n. 11, p. 829-835, December, 2005.

HILL, J.O. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 7, p. 750-761, November, 2006.

IACOBELLIS, G.; POND, C.M.; SHARMA, A.M. Different "weight" of cardiac and general adiposity in predicting left ventricle morphology. **Obesity**, v. 14, n. 10, p. 1679-1684, October, 2006.

JERNIGAN, N.L.; WALKER, B.R.; RESTA, T.C. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca^{2+} sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. 515-529, September, 2008.

JIN, L.; YING, Z.; WEBB, R.C. Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 4, p. 1495-1500, October, 2004.

JOSEPH, J.W. et al. Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 279, v. 49, p. 51049-51056, December, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 210-219 p.

KATAKAM, P.V. et al. Impaired mitochondria-dependent vasodilation in cerebral arteries of Zucker obese rats with insulin resistance. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 2, p. 289-298, February, 2009.

KENCHIAIAH, S. et al. Obesity and the risk of heart failure. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 305-313, August, 2002.

KETONEN, J. et al. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. **Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society**, v. 74, n. 7, p. 1479-1487, July, 2010.

KOBAYASI, R. et al. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat-diet- induced obesity in mice. **Journal of Hypertension**, v. 28, n. 10, p. 2111-2119, October, 2010.

KOPELMAN, P. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 1, p. 635-643, April, 2000.

KOWALTOWSKI, A.J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-343, August, 2009.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 3, p. 463-471, February, 1999.

KRAUSS, S. et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1831-1842, December, 2003.

LARSSON, B. et al. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. **British Medical Journal**, v. 288, n. 6428, p. 1401-1404, May, 1984.

LEE, D.S. et al. Antecedent blood pressure, body mass index, and the risk of incident heart failure in later life. **Hypertension**, v. 50, n. 5, p. 869-876, September, 2007.

LIESA, M.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiological Reviews**, v. 89, v. 3, p. 799-845, July, 2009.

LIU, H. et al. Improvement of thoracic aortic vasoreactivity by continuous and intermittent exercise in high-fat diet-induced obese rats. **Biomedical Reports**, v. 3, n. 4, p. 527-532, July, 2015.

LOBATO, N.S. et al. The adipokine chemerin augments vascular reactivity to contractile stimuli via activation of the MEK-ERK1/2 pathway. **Life Sciences**, v. 91, n. 1, p. 600-606, April, 2012.

LÖHN, M. et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 1, p. 1057-1063, July, 2002.

LOIRAND, G.; GUÉRIN, P.; PACAUD, P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. **Circulation Research**, v. 98, n. 3, p. 322-334, February, 2006.

LOPES, H.F. Hypertension and inflammation: contribution of obesity. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14, n. 4, p. 239-244, October, 2007.

MA, L. et al. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction a remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet induced obese rats. **Hypertension Research**, v. 33, n. 1, p. 446-453, February, 2010.

MAILLOUX, R.J.; HARPER, M.E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, n. 6, p. 1106-1115, September, 2011.

MALEY, G.F.; PLAUT, G.W. Oxidative phosphorylation by heart muscle mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 14, n. 3, p. 443-444, July, 1954.

MARCHESI, C. et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. **Hypertension**, v. 54, n. 6, p. 1384-1392, May, 2009.

MATTHEWS, D.R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, July, 1985.

McBRIDE, H.M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. **Current Biology**, v. 16, n. 14, p. 551-560, July, 2006.

MEDINA-GOMEZ, G. Mitochondria and endocrine function of adipose tissue. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 6, p. 791-804, December, 2012.

MIAO, C.Y.; LI, Z.Y. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 643-658, February, 2012.

MUNDY, A.L. et al. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 2, p. 368-375, January, 2007.

NAIK, J.S.; XIANG, L.; HESTER, R.L. Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. 154-161, January, 2006.

NAKAMURA, M. et al. Association between basal serum and leptin levels and changes in abdominal fat distribution during weight loss. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 6, n. 1, p. 28-32, May, 2000.

NARUSE, K. et al. Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 691-698, March, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 685-715 p.

NICHOLLS, D.G. A history of UCP1. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 29, n. 6, p. 751-755, November, 2001.

NICHOLLS, D.G.; RIAL, E. A history of the first uncoupling protein, UCP1. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 31, n. 5, p. 399-406, January, 1999.

NISHIMATSU, H. et al. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 4, p. 1770-1776, April, 2005.

OSELLAME, L.D.; BLACKER, T.S.; DUCHEN, M.R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 711-723, May, 2012.

OWEN, M.K.; WITZMANN, F.A.; MCKENNEY, M.L. Perivascular adipose tissue potentiates contraction of coronary vascular smooth muscle: influence of obesity. **Circulation**, v. 128, n. 1, p. 9-18, January, 2013.

PARADIES, G. et al. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 39, p. 14205-14218, October, 2014.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**, v. 31, n. 2, p. 170-180, February, 2008.

PETERS, S.L. et al. Reactive oxygen species-induced aortic vasoconstriction and deterioration of functional integrity. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 361, n. 2, p. 127-133, February, 2000.

PRINS, J.B. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 639-651, March, 2002.

PUNG, Y.F. et al. Resolution of mitochondrial oxidative stress rescues coronary collateral growth in Zucker obese fatty rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 32, n. 2, p. 325-334, February, 2012.

RICQUIER, D.; KADER, J.C. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 73, n. 3, p. 577-583, September, 1976.

RIPPE, C. et al. Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 279, n. 2, p. 293-300, August, 2000.

SAVINI, I. et al. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, May, 2013.

SCHINZARI, F. et al. Rho-kinase inhibition improves vasodilator responsiveness during hyperinsulinemia in the metabolic syndrome. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 303, n. 6, p. 806-811, September, 2012.

SCHRAUWEN, P.; WESTERTEP, K.R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **The British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 4, p. 417-427, October, 2000.

SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-2180, May, 2007.

SIDDIQUI, A.H.; HUSSAIN, T. Enhanced AT1 receptor-mediated vasocontractile response to ANG II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 4, p. 1722-1727, April, 2006.

SILVA, B.R. et al. Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 721, n. 1, p. 193-200, December, 2013.

SILVA, M.A.B. et al. Mineralocorticoid receptor blockade prevents vascular remodeling in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. **Clinical Science**, v. 129, n. 7, p. 533-545, May, 2015.

SOLIMAN, H. et al. Partial deletion of ROCK2 protects mice from high-fat diet-induced cardiac insulin resistance and contractile dysfunction. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 1, p. 70-81, July, 2015.

SOLTIS, E.E.; CASSIS, L.A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 13, n. 2, p. 277-296, April, 1991.

SOMOZA, B.; GUZMÁN, R.; CANO, V. Induction of cardiac uncoupling protein-2 expression and adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase phosphorylation during early states of diet-induced obesity in mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 924-931, April, 2007.

STYSKAL, J. et al. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n. 1, p. 45-58, January, 2012.

SUN, X. et al. Effect of high free fatty acids on the anti-contractile response of perivascular adipose tissue in rat aorta. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 63, n. 1, p. 169-174, October, 2013.

SUZUKI, H. et al. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 25, n. 1, p. 1083-1089, April, 1995.

SVERDLOV, A.L. et al. High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 78, n. 1, p. 165-173, January, 2014.

SZASZ, T; BOMFIM, G.F.; WEBB, R.C. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. **Vascular Health and Risk Management**, v. 9, n. 1, p. 105-116, January, 2013.

TAYLOR, B.A.; PHILLIPS, S.J. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. **Genomics**, v. 34, n. 1, p. 389-398, April, 1996.

TRAUPE, T. et al. Obesity increases prostanoid-mediated vasoconstriction and vascular thromboxane receptor gene expression. **Journal of Hypertension**, v. 20, n. 11, p. 2239-2245, November, 2002.

TURRENS, J.F.; BOVERIS, A. Generation of the superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **The Biochemical Journal**, v. 191, n. 2, p. 421-427, November, 1980.

VAN DE VOORDE, J. et al. Perivascular adipose tissue, inflammation and vascular dysfunction in obesity. **Current Vascular Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 403-411, May, 2014.

VERLOHREN, S. et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. **Hypertension Research**, v. 44, n. 1, p. 271-276, August, 2004.

WAJCHENBERG, B.L. Tecido adiposo como glândula endócrina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 44, n. 1, p. 13-20, Fevereiro, 2000.

WALKER, G.E. et al. The pathophysiology of abdominal adipose tissue depots in health and disease. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 19, n. 1, p. 57-74, July, 2014.

WEBER, D.S.; WEBB, R.C. Enhanced relaxation to the rho-kinase inhibitor Y-27632 in mesenteric arteries from mineralocorticoid hypertensive rats. **Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 129-133, August, 2001.

WOODS, S.C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1081-1087, April, 2003.

World Health Organization 2014. Fact sheet: obesity and overweight in world and Brazil. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>. Accessed in January 30, 2015.

YIN, X. et al. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 2, p. 209-216, February, 2014.

ZHANG, D.X.; GUTTERMAN, D.D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 5, p. 2023-2031, May, 2007.

ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162-168, November, 1997.

ZOROV, D.B. et al. Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. **Biosciences Reports**, v. 17, n. 6, p. 507-520, December, 1997.

ZOROV, D.B. et al. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, n. 1, p. 509-517, May, 2006.

ZOROV, D.B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 909-950, July, 2014.

Anexos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 149/2014, sobre o projeto intitulado “*Disfunção mitocondrial no tecido adiposo perivascular e seu papel nas alterações vasculares em modelo experimental de obesidade*”, sob a responsabilidade da Professora Doutora Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 24 de novembro de 2014.

We certify that the protocol nº 149/2014, entitled “*Mitochondrial dysfunction in perivascular adipose tissue and its role in vascular changes in experimental model of obesity*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 11/24/2014.

Ribeirão Preto, 24 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP