ANDRÉ BENTO CHAVES SANTANA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA CARDIOVASCULAR ASSOCIADA AO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E À DIETA HIPERLIPÍDICA**

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

São Paulo
2013

ANDRÉ BENTO CHAVES SANTANA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA CARDIOVASCULAR ASSOCIADA AO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E À DIETA HIPERLIPÍDICA**

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profª Drª Silvia Lacchini

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Santana, André Bento Chaves.

Resposta inflamatória cardiovascular associada ao sistema renina-angiotensina à dieta hiperlipídica / André Bento Chaves Santana. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Lacchini.

Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Ação do sistema renina angiotensina sobre o sistema cardiovascular.

Versão do título para o inglês: Cardiovascular inflammatory response associated to renin-angiotensin system and to high-fat diet.

1. Dieta hiperlipídica 2. Aorta 3. Enrijecimento 4. Inflamação
5. ECA 6. TGF-beta I. Lacchini, Profa. Dra. Silvia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB0201/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): André Bento Chaves Santana.

Título da Dissertação: Resposta inflamatória cardiovascular associada ao sistema renina-angiotensina à dieta hiperlipídica.

Orientador(a): Profa. Dra. Silvia Lacchini.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **78** nas fls. **08** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Silvia Lacchini**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Resposta inflamatória cardiovascular associada ao sistema renina-angiotensina e a dieta hiperlipídica*" do qual participam o(s) aluno(s) **André Bento Chaves Santana, Thais Cristina Souza de Oliveira, Cintia Taniguti Lima, Barbara Lobo Bianconi**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **18.06.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 24 de junho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha mãe Fran com todo carinho e amor possível.

Aos meus irmãos Fernando e Lucas com todo amor e afeto.

À minha querida prima Daniela.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Fran, pelo amor incondicional, único e verdadeiro com o qual pude contar sempre. Não sei como eu poderia retribuir tudo isso. Mãe, tenho o maior orgulho de ser seu filho!

Aos meus irmãos Fernando pelo apoio ao longo deste tempo com uma série de questões não apenas financeiras e burocráticas (quantos e quantos documentos eu te pedi não foi?), mas também pela preocupação, carinho e amizade.

Ao meu irmão Lucas pelo carinho, pelas conversas e todo amor fraternal.

À minha querida prima Daniela, por todo apoio e amizade ao longo destes anos.

À Prof^a Sílvia Lacchini, pela oportunidade de trabalhar junto à sua equipe, além dos ensinamentos e de sua dedicação como orientadora. Quero ressaltar a sua importância em um momento da minha vida, momento este de insegurança quanto ao ingresso na Pós-Graduação e as minhas reais chances na área de pesquisa científica. Ao estender a sua mão e ter me aceitado como aluno de mestrado, hoje eu tenho a confiança de continuar seguindo na área científica.

Aos colegas de laboratório Thaís, Nara, Kátia, Tati 1, Tati 2, Tati 3, Cintia, Túlio, Júnior, Letícia, Rafaela e Ricardo. Em especial quero agradecer à Barbara Bianconi não apenas pela ajuda com experimentos, mas também pela amizade e paciência.

Ao Fábio e Renivaldo por toda a ajuda com os camundongos e com a organização do biotério.

Ao Prof^o Dr^o Valério Garrone não somente pela ajuda com experimentos de Immunoblotting e atividade enzimática, mas pelos ensinamentos, discussões de experimentos e ideias que embasam um projeto de pesquisa.

À Dr^a Luciene Campos pelo auxílio em experimentos realizados no InCor.

Ao Márcio Chaves, por me auxiliar no uso do microscópio no InCor.

Ao Prof^o Dr^o José Eduardo Krieger por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu realizasse os experimentos de Immunoblotting e atividade enzimática.

À Prof^a Dr^a Maria Cláudia Irigoyen por sua generosidade em oferecer a estrutura necessária para realização de ensaios hemodinâmicos e pelo aporte financeiro na compra de materiais.

À Prof^a Dr^a Patricia Fiorino e a Bruna Kogici pela ajuda com as dosagens séricas de lipídios e de glicose no Mackenzie.

A Prof^a Dr^a Primavera Borelli e ao Ed Wilson Cavalcanteda FCF/USP, pelo fornecimento e elaboração das rações empregadas do meu projeto.

À Martinha, pelas preciosas dicas sobre colorações histológicas.

À Patrícia Rodrigues de Campos, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, pelo auxílio com inúmeros formulários, declarações e entrega de relatórios ao longo do período que cumpri o mestrado.

À Profª Drª Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais.

Aos colegas de pós-graduação do curso de Ciências Morfofuncionais.

Aos professores e funcionários do Departamento de Anatomia – ICB.

Às minhas amigas “Fundamentais” Aline Ignácio e Magna Magalhães pela amizade desde a graduação até os dias de hoje.

Aos amigos do curso de Ciências Fundamentais Para a Saúde: Leonardo, Renan, Wesley, Bruna, Clarissa, Caio e Jonatan.

Aos amigos do CRUSP Tadeu, Dheisson, Daniel, Rodrigo, Mariana. Em especial quero agradecer ao André Calazans e à Rosana de Oliveira.

Aos camundongos utilizados no projeto.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Mafalda – Quino.

“Por aprendizagem significativa, entendo, aquilo que provoca profunda modificação no indivíduo. Ela é penetrante, e não se limita a um aumento de conhecimento, mas abrange todas as parcelas de sua existência.”

Carl Rogers

RESUMO

CHAVES-SANTANA, A. B. **Resposta inflamatória cardiovascular associada ao sistema renina-angiotensina e à dieta hiperlipídica**. 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Neste estudo foi empregado um modelo murino submetido à dieta hiperlipídica para estudo de alterações cardiovasculares. O presente trabalho tem como objetivo investigar, em aortas e corações de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica: 1) as possíveis respostas pré-inflamatórias iniciadas pela dieta hiperlipídica por estresse oxidativo; 2) a ação do SRA via atividade da ECA; 3) o efeito sobre o TGF- β como marcador de remodelamento vascular. Para isso foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos com 8 semanas de vida, os quais foram divididos nos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica. Após 8 semanas buscou-se avaliar: o perfil de peso corpóreo ao longo da dieta, a porcentagem de tecido adiposo, perfil da pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca. Após a eutanásia dos animais foram avaliados o perfil lipídico sérico e a glicemia de cada animal. Também foram feitos nos tecidos aórticos e cardíacos ensaios de *immunoblotting* para detecção enzimática de enzima conversora de angiotensina I (ECA) e fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β), o ensaio de atividade ECA e de mieloperoxidase (MPO). Foram realizadas análises histológicas e imuno-histoquímicas nas aortas dos animais de cada grupo das dietas, avaliando-se: 1) morfometria e análise de fibras colágenas, usando a coloração de *picrossirius*; 2) fibras colágenas e elásticas, usando a coloração de *Weigert-Van Gieson*. 3) Imuno-histoquímica para marcação de ECA e TGF- β . Os camundongos mantidos em dieta hiperlipídica obtiveram um aumento de peso corporal, assim como o ganho de tecido adiposo. Observou-se aumento nas taxas de colesterol, LDL e glicose séricas, ao passo que a pressão arterial sistólica reduziu. Além disso, os tecidos aórtico e cardíaco apresentaram aumento da atividade enzimática da MPO; entretanto, somente em aortas houve o aumento da expressão e atividade da ECA, bem como da expressão proteica de TGF- β . As artérias cardíacas não sofreram alterações morfológicas frente à dieta hiperlipídica; contudo, as aortas apresentaram aumento das fibras colágenas espessas e da deposição e desorganização do colágeno total na túnica adventícia. Assim, os resultados obtidos sugerem que a dieta lipídica em modelo murino é capaz de provocar o remodelamento vascular via estresse oxidativo, de modo a induzir a atividade da ECA e a liberação de TGF- β , e o estresse oxidativo local.

Palavras-chave: Dieta Hiperlipídica. Aorta. Enrijecimento. Inflamação. ECA. TGF-beta

ABSTRACT

CHAVES-SANTANA, A. B. **Cardiovascular inflammatory response associated to renin-angiotensin system and to high-fat diet.** 2014. 77 p. Masters thesis (Morphofunctional Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

In this study, a murine model underwent high-fat diet to study of cardiovascular changes. The present study aims to investigate in aortas and hearts of mice undergoing high-fat diet: 1) the possible pre - inflammatory responses initiated by high-fat diet by oxidative stress, 2) the action of the RAS by ACE activity, 3) the effect on the TGF- β as a marker of vascular remodeling. For that C57BL/6 mice at 8 weeks of life, which were divided in groups control diet and high fat diet were used. After 8 weeks, we sought to evaluate: the profile of body weight throughout the diet, the percentage of adipose tissue, profile systolic blood pressure and heart rate. After euthanasia of animals were evaluated serum lipid and glycemic profile. In aortic and cardiac tissues were also performed immunoblotting assays for detecting enzyme angiotensin converting enzyme (ACE) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β) factor, enzymatic activity assays for ACE and MPO. Histological and immunohistochemical analyzes were performed on the aortae of the mice in each group diets, evaluating: 1) morphometry and analysis collagen using picosirius staining, 2) Collagen and elastic fibers, using staining *Weigert-Van Gieson*. 3) Immunostaining for marking ACE and TGF- β . The mice kept on high-fat diet increased pericardial obtained, as well as the gain of adipose tissue. The mice kept on high fat diet had increased body weight gain as well as adipose tissue. An increase in the rates of cholesterol, LDL cholesterol and serum glucose was observed, whereas the systolic blood pressure decreased. In addition, aortic and cardiac tissues showed increased enzymatic activity of MPO, however, only in aortae was increased expression and ACE activity and protein expression of TGF- β . The cardiac arteries did not undergo morphological changes associated with high-fat diet, however, the aortae showed increased thick collagen fibers and deposition and disorganization of the total collagen in the tunica adventitia. Thus, the results suggest that the high-fat diet in mice is able to induce vascular remodeling via oxidative stress, in order to induce ACE activity and release of TGF- β , and local oxidative stress.

Keywords: High-fat diet. Aorta. Stiffness. Inflammation. ACE. TGF-beta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da parede vascular arterial e seus componentes	18
Figura 2. Esquema geral do sistema renina angiotensina	21
Figura 3. Esquema de lesão vascular induzida pela ação da MPO	28
Figura 4. Sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos	33
Figura 5. Imagem representativa das quantificações de ondulação das fibras colágenas na túnica adventícia realizada no programa ImageJ	40
Figura 6. Curva temporal do peso corpóreo dos camundongos submetidos às dietas	46
Figura 7. Relação entre peso do coração e comprimento naso-anal dos camundongos	47
Figura 8. Imageamento por raio-X com filtro para visualização de tecido adiposo – Imagens representativas	48
Figura 9. Análise morfométrica das artérias cardíacas e aortas	51
Figura 10. Fotomicrografias representativas de aortas dos camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica em coloração de Weigert-Van Gieson	52
Figura 11. Razão entre a área das fibras colágenas e área das fibras elásticas delgadas nas aortas de camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica	53
Figura 12. Fotomicrografias representativas de aortas dos camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica	54
Figura 13. Quantificação de fibras colágenas delgadas e espessas na túnica adventícia de aortas	55
Figura 14. Quantificação da ondulação de fibras colágenas na túnica adventícia em aortas e distribuição angular das fibras colágenas	56
Figura 15. Atividade enzimática da ECA em aortas e corações de camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica	57
Figura 16. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de ECA em aortas	58
Figura 17. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de TGF- β em aortas	59
Figura 18. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de ECA no coração	60
Figura 19. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de TGF- β no coração	61
Figura 20. Atividade enzimática da MPO em aortas e corações	62
Figura 21. Fotomicrografias descritivas de imunomarcção para ECA em aortas de camundongos submetidos às dietas	63
Figura 22. Fotomicrografias descritivas de imunomarcção para TGF- β em aortas de camundongos submetidos às dietas	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das Rações (g/Kg ração)	32
Tabela 2. Classificação de fibras colágenas coradas com Picrossirius em luz polarizada ...	39
Tabela 3. Medidas de ganho de peso corpóreo e porcentagem de tecido adiposo em camundongos mantidos com as dietas depois de 8 semanas.....	49
Tabela 4. Medidas de frequência cardíaca e pressão arterial sistólica em camundongos mantidos com as dietas depois de 8 semanas.....	49
Tabela 5. Medidas séricas de HDL, LDL, VLDL colesterol, triglicérides e glicose em camundongos mantidos com as dietas depois de 8 semanas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I – angiotensina I
Ang II – angiotensina II
AT1r – receptor 1 de angiotensina II
AT2r – receptor 2 de angiotensina II
Ac – anticorpo
ECA – enzima conversora de angiotensina 1
DAB – 3,3 diaminobenzidina
DDT – dicloro-difenil-tricloroetano
ERO – espécie reativa de oxigênio
FC – frequência cardíaca
HDL – lipoproteína de alta densidade
IHQ – imuno-histoquímica
IL-6 – interleucina6
LDL – lipoproteína de baixa densidade
MEC – matriz extracelular
MgCl₂ – cloreto de magnésio
MPO – mieloperoxidase
MMPs – metaloproteinases de matriz
NO – óxido nítrico
PMSF – fluoreto de fenilmetanossulfonila
PBS – tampão fosfato de sódio
SRA – sistema renina-angiotensina
SDS – dodecil sulfato de sódio
TGF-β – fator transformante de crescimento beta 1
TNF-α – fator de necrose tumoral alfa
VLDL – lipoproteína de baixíssima densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Enrijecimento arterial	16
1.2 Aorta, parede vascular e matriz colágena	17
1.3 Sistema renina-angiotensina	20
1.4 Colesterol, HDL, LDL e triglicérides	22
1.5 Dislipidemias e doenças cardiovasculares	23
1.6 Obesidade e ação hormonal inflamatória	24
1.7 Ação da Ang II na produção do TGF- β	25
1.8 Estresse oxidativo e ação da mieloperoxidase	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Dieta controle e dieta hiperlipídica	31
4.3 Protocolos das dietas	32
4.4 Avaliações indiretas da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca	32
4.5 Visualização do tecido adiposo in vivo e quantificação	34
4.6 Eutanásia	34
4.7 Coleta de sangue	34
4.8 Coletas de tecidos	34
4.9 Avaliações do perfil lipídico sérico	35
4.10 Avaliações do perfil glicêmico sérico	36
4.11 Processamentos de tecidos, microtomia e preparo das lâminas	37
4.12 Avaliações da rede elástica e da rede colágena aórtica por Weigert-Van Gieson	37
4.13 Avaliações da rede colágena vascular por picrossírius	38
4.14 Quantificação de fibras colágenas usando microscopia de luz polarizada	39
4.15 Atividade enzimática da ECA	41
4.16 Avaliação de expressão proteica de ECA e TGF- β por Immunoblotting	42
4.17 Atividade enzimática da mieloperoxidase	43
4.18 Detecções de ECA e TGF- β por imuno-histoquímica	44
4.19 Análise estatística	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Peso corpóreo, peso do relativo do coração e porcentagem de tecido adiposo	46
5.2 Avaliação da FC e PAS	49

5.3 Avaliação do perfil lipídico e glicêmico sérico	50
5.4 Análise morfométrica das artérias cardíacas e aortas	51
5.5 Análise microscópica das fibras colágenas e elásticas por Weigert-VanGieson	52
5.4 Análise microscópica das fibras colágenas coradas com picrossirius	54
5.5 Atividade enzimática da ECA	57
5.6 Avaliação da expressão proteica da ECA e TGF- β	58
5.7 Atividade enzimática da MPO	62
5.8 Análise descritiva da imunomarcação para ECA e TGF- β em aortas	63
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares e o diabetes representam cerca de 245 mortes a cada 100.000 habitantes no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013). No Brasil, doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) representam 72,4% das causas de óbitos de causas registradas, sendo as doenças cardiovasculares responsáveis por 80,7% de tais mortes (BRASIL, 2011).

Diversos estudos têm sido feitos a respeito das doenças vasculares, tendo em vista que são elas as principais causas de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental. Os desfechos mais comuns são infartos do miocárdio e cerebral, hipertensão arterial, isquemia cardíaca, aneurisma de aorta e doença vascular periférica. Tais processos patológicos são decorrentes de arterioesclerose que contribui para lesões degenerativas, e fibrose em pequenas artérias, ou aterosclerose, doença de artérias elásticas com grande camada média, principalmente, coronárias, aorta, carótidas, grandes artérias cerebrais e periféricas (ROSS, 1986). Os mecanismos que determinam ou levam ao desenvolvimento de tais doenças ainda não foram completamente esclarecidos devido à grande complexidade das interações celulares tanto em situações fisiológicas quanto patológicas.

1.1 Enrijecimento arterial

Doenças e lesões aórticas também são uma importante causa de mortalidade, sendo os aneurismas, dissecções, oclusões ateroscleróticas e enrijecimento as causas mais frequentes (TSAMIS; KRAWIEC; VORP, 2013). A rigidez arterial é uma epidemia crescente associada ao aumento de riscos de eventos cardiovasculares, demência e morte (CHEN et al., 2013).

A diminuição da complacência vascular arterial altera a pressão e a dinâmica do fluxo sanguíneo, promovendo impactos no desempenho cardíaco e na perfusão coronária (ZIEMAN; MELENOVSKY; KASS, 2005). O enrijecimento arterial é caracterizado pelo progressivo enrijecimento de vasos de condutância, contribuindo para a alteração do fluxo sanguíneo na rede vascular periférica, precedendo os aumentos da pressão arterial sistólica arterial e incidência de hipertensão arterial (PALATINI et al., 2011). Naturalmente o envelhecimento contribui para o processo

rididez, entretanto a obesidade também promove efeitos adversos sobre o sistema vascular incluindo o enrijecimento aórtico (CHEN et al., 2013; TSAMIS; KRAWIEC; VORP, 2013).

1.2 Aorta, parede vascular e matriz colágena

As artérias são órgãos complexos cuja parede é um conjunto ativo e integrado composto por células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos, interligados uns aos outros por uma rede de interações autócrinas e parácrinas, podendo se adaptar a múltiplas variações hemodinâmicas e mecânicas (GIMBRONE; TOPPER, 1997).

As artérias são responsáveis pela condução do sangue do coração para a rede capilar nos tecidos. As artérias elásticas, como a aorta, possuem paredes vasculares com grande capacidade de distensão, de modo a receber o grande volume de ejeção na sístole ventricular (AYRES et al., 2012)

A parede vascular é uma estrutura complexa que responde a uma série de alterações em situações patológicas sob efeitos hemodinâmicos e não hemodinâmicos, como a inflamação.

A parede dos vasos sanguíneos é composta por camadas de tecido organizadas de forma concêntrica denominadas túnicas, as quais são denominadas túnicas íntima, média e adventícia (figura 1).

A túnica íntima (também chamada de túnica interna) é composta por camadas de tecido epitelial e conjuntivo. O revestimento da túnica íntima é o epitélio simples pavimentoso especializado chamado de endotélio, que se apresenta contínuo ao longo de todo o sistema vascular (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Logo abaixo do endotélio encontra-se a membrana basal, ou lâmina basal, que se liga de forma eficaz o endotélio ao tecido conjuntivo. A membrana basal fornece força, mantendo a flexibilidade, e se apresenta permeável, permitindo que os materiais passem através dela (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). A fina camada exterior da camada íntima contém uma pequena quantidade de fibras elásticas para proporcionar flexibilidade, e também contém algumas fibras de colágeno para proporcionar resistência adicional (KIERSZENBAUM; TRES, 2012).

Figura 1. Representação da parede vascular arterial e seus componentes

Ilustração da parede vascular arterial (Open Stax, 2013). A parede vascular é composta basicamente por 3 camadas: túnica íntima; túnica média; e túnica adventícia. Estruturas vasculares e nervosas como a *vasa vasorum* e *nervi vasorum* estão localizados na túnica adventícia da parede vascular de artérias de grande calibre.

Em artérias de maior calibre, há também uma camada distinta constituída de fibras elásticas conhecidas como a membrana elástica interna (também chamada de lâmina elástica interna) no limite com a camada média (WAGENSEIL; MECHAM, 2009). Abaixo do endotélio existe também uma camada denominada subendotelial, a qual possui filamentos de conexão e ancoragem constituídos por fibrina e fibras de colágeno, sendo que em ratos e camundongos não há a presença de células (GERRITY; CLIFF, 1972).

A túnica média é a camada do meio da parede do vaso (figura 1). Ela é geralmente a camada mais espessa nas artérias, sendo mais espessa nestas do que nas veias (WAGENSEIL; MECHAM, 2009). A túnica média é composta por camadas de músculo liso sustentadas por uma matriz extracelular (MEC), essencialmente constituída por macromoléculas como colágeno, glicoproteínas não colágenas, proteoglicanos e fibras elásticas, a maioria dos quais estão dispostas em folhas circulares (WAGENSEIL; MECHAM, 2009). Na porção exterior da túnica, existem também as camadas de células musculares lisas. A contração e o

relaxamento da camada muscular lisa diminui e aumenta respectivamente o diâmetro da luz do vaso (WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

A camada de células musculares lisas da túnica média é suportada por uma estrutura de fibras colágenas que se ligam a camada média com as túnicas interna e externa. Juntamente com as fibras de colágeno se encontra um grande número de fibras elásticas, que aparecem como linhas onduladas em cortes histológicos (METTOUCHI, 2012).

O colágeno é encontrando de forma abundante na MEC atuando na manutenção da integridade e resistência à tensão na parede vascular (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003). Os tipos de colágenos mais presentes na parede vascular são os colágenos I, III, IV, V e VI (PLENZ et al., 2003). Delimitando morfologicamente a túnica média, existe a lâmina elástica externa que serve de camada de transição à túnica adventícia (TENNANT; MCGEACHIE, 1990).

A túnica adventícia (também chamada de túnica externa) é uma bainha substancial do tecido conjuntivo composta principalmente de fibras de colágeno. Algumas bandas de fibras elásticas também podem ser encontradas nesta túnica (STENMARK et al., 2013). As camadas exteriores da túnica adventícia são ricas em colágeno dos tipos I e III produzido por células musculares lisas.

Em microscopia de luz, estas camadas não são distintas, mas integram-se com o tecido conjuntivo em torno do lado externo do vaso, ajudando-o a manter sua estrutura vascular. Em processos patológicos vasculares, como também no envelhecimento, a deposição de colágeno na parede arterial encontra-se alterada, enrijecendo a parede do vaso (STENMARK et al., 2013). A deposição de colágeno apresenta um importante papel funcional na adventícia, fortalecendo a parede do vaso, ajudando a prevenir a ruptura do mesmo. Entretanto, em estados patológicos como um quadro de hipertensão arterial e diabetes, o aumento da deposição de colágeno em longo prazo pode gerar um enrijecimento da parede arterial, comprometendo a distensibilidade vascular e contribuindo para uma retroalimentação do processo hipertensivo (CAMPBELL et al., 2011).

1.3 Sistema renina-angiotensina

Classicamente, o sistema renina-angiotensina (SRA) é descrito como uma cascata de reações bioquímicas cuja atuação é essencial para a homeostasia cardiovascular (Figura 2). A cascata de reações se inicia a partir da clivagem do angiotensinogênio produzido no fígado, pela enzima renina produzida por células justaglomerulares renais. A renina tem sua liberação estimulada diante de situações de redução da pressão arterial, do aumento da atividade de nervosa simpática renal ou da redução acentuada de sódio (PUTNAM et al., 2012). A partir da clivagem do angiotensinogênio obtém-se a angiotensina I (Ang I) a qual é convertida em Ang II pela ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA) produzida principalmente pelo endotélio.

A ECA, uma dipeptidilcarboxipeptidase, pertence à família de zinco-metalopeptidase, e possui um íon zinco alinhado em seus sítios ativos, essencial para a catálise. Ela apresenta-se como uma ectoenzima ligada à membrana por seu segmento hidrofóbico carboxi-terminal ou como molécula circulante nos fluidos orgânicos (HOOPER, 1991).

Na literatura, são descritas classicamente duas formas de ECA: a somática e a testicular. São descritas ainda formas de ECA solúveis. A ECA somática (150-180 kDa) possui dois domínios catalíticos, N- e C- domínios e pode ser encontrada em células endoteliais, epiteliais e neuronais (BERNSTEIN et al., 2013; CAMPBELL, 1987). A ECA testicular ou germinal (90-110 kDa) é similar à porção C-terminal da ECA somática e é encontrada unicamente nos testículos, onde é expressa apenas durante a maturação na espermatogênese. A ECA solúvel é detectada no fluido ileal, seminal, na urina e no líquido amniótico (BEHNIA, 2003; ERDOS, 1990; IGIC;).

A angiotensina II (Ang II) é o principal agente efetor do SRA na homeostasia e função cardiovascular, atuando através dos receptores do tipo AT1 (AT1r), AT2 (AT2r). Além dos efeitos envolvidos nos processos hemodinâmicos, a Ang II age principalmente via receptores do tipo AT1, os quais podem ativar vias de sinalização intracelulares indutoras da produção de mediadores inflamatórios (CARVALHO et al., 1987; TADDEI et al., 2002).

Outras formas de produção de Ang II ocorrem no endotélio, na musculatura lisa e nos tecidos cerebrais, adrenais, renais e ovarianos assim como no plasma,

sendo estes processos independentes da ação da ECA (CARVALHO et al., 1987; SKRBIC; IGIC, 2009)

Figura 2. Esquema geral do sistema renina angiotensina

Esquema geral do sistema renina-angiotensina clássico. A enzima renina cliva o angiotensinogênio em angiotensina I; a angiotensina I é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina II (ECA). A angiotensina II pode atuar principalmente nos receptores AT1 e AT2. Nas artérias, o conjunto de tais respostas via AT1 e AT2 pode regular respostas pró-hipertensivas, pró-fibróticas e pró-aterosclerótica.

1.4 Colesterol, HDL, LDL e triglicérides

O colesterol é um composto lipídico presente em células e líquidos orgânicos, é componente fundamental da membrana celular, modulando a fluidez desta camada e a ativação de enzimas aderidas à membrana (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). O colesterol atua ainda como substrato de diversas vias metabólicas, como a biossíntese de vitamina D, dos hormônios esteróides e do metabolismo dos sais biliares (QIN et al., 2006). Para que possa exercer sua função no metabolismo lipídico, o colesterol depende fundamentalmente das lipoproteínas, também chamadas apolipoproteínas, que são compostas por lipídios e proteínas e responsáveis pelo seu transporte no plasma (QIN et al., 2006).

As lipoproteínas se diferenciam em quatro tipos: as maiores e menos densas, ricas em triglicerídeos (quilomícrons de origem intestinal); as lipoproteínas hepáticas de densidade muito baixa (VLDL); as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL). Os quilomícrons atuam transportando os lípidos da dieta (via exógena) (KWITEROVICH, 2000).

A maior parte do colesterol no plasma é transportada em três classes principais de lipoproteínas: colesterol VLDL (VLDL-C), colesterol LDL (LDL-C) e colesterol HDL (HDL-C). O colesterol total é a soma de todos o colesterol transportado por estas 3 lipoproteínas (KWITEROVICH, 2000).

A gordura obtida pela dieta é segregada a partir de células intestinais de quilomícrons em um processo que requer a apolipoproteína B-48. O triglicerídeo no núcleo dos quilomícrons é hidrolisado em ácidos graxos livres e glicerol pela lipoproteína lipase com auxílio do co-fator apolipoproteína C-II, contribuindo assim para a produção de quilomícron menor remanescente. Este quilomícron remanescente é removido em primeiro lugar por um receptor de quilomícron remanescente no fígado, conhecida como a proteína semelhante ao receptor de LDL semelhantes (KWITEROVICH, 2000). O transporte dos lípidos hepáticos no sangue ocorre por meio da VLDL e de LDL, as quais possuem lipoproteína apoB-100 (via endógena) e são removidos pelo fígado através da ligação com receptores específicos, sendo que o mais aparente é o receptor da LDL (PIRILLO; NORATA; CATAPANO, 2013). No plasma, os triglicéridos contidos na VLDL são convertidos em ácidos graxos livres e glicerol pela ação de lipases de lipoproteínas e seu co-

factor, apolipoproteína C-2. Isto resulta na produção de moléculas de VLDL pequenas e, em último caso, em partículas remanescentes denominadas IDL (lipoproteína de densidade intermediária) (KWITEROVICH, 2000). Algumas das partículas de IDL são removidos através da interação com a apolipoproteína E e com o receptor de LDL sobre a superfície do fígado, ou podem ser ainda ser hidrolisados por lipase hepática para produzir LDL (KWITEROVICH, 2000).

A LDL é responsável por aproximadamente 70% transporte total de colesterol no plasma. Quando as concentrações de LDL circulante estão elevadas, como no caso da diminuição dos receptores de LDL (LDLr), eleva-se o risco de desenvolvimento de aterosclerose, capaz de promover a ativação plaquetária e a expressão do fator tecidual (TF) (ASSMANN; NOFER, 2003).

Se o LDL é oxidado, que pode entrar no macrófago através dos receptores CD36 as partículas de HDL nascentes são feitas no fígado e no intestino (ASSMANN; NOFER, 2003). Estas são segregadas como partículas que contêm principalmente de fosfolípidos e de apo A-1. O HDL interage com células periféricas, tais como os macrófagos, e remove o colesterol (ASSMANN; NOFER, 2003). As partículas HDL são feitas no fígado e no intestino, sendo que a maioria destas partículas contêm apolipoproteína A1 (apoA1) (ASSMANN; NOFER, 2003).

HDL-C parece ter propriedades cardioprotetoras por causa de seu envolvimento em certos processos, como transporte reverso de colesterol e inibição da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) oxidação (GORDON et al., 1989). A HDL é capaz de impedir a oxidação de LDL, e também pode transferir o colesterol dos macrófagos de volta para o plasma, num processo conhecido como o transporte reverso do colesterol (RIGOTTI et al., 1997).

Assim, neste contexto as lipoproteínas têm um papel importante no transporte de lipídios na circulação. Entretanto, algumas vezes, ocorrem distúrbios que promovem uma diminuição das lipoproteínas (hipolipoproteinemia) ou mais comumente o seu aumento (hiperlipoproteinemia).

1.5 Dislipidemias e doenças cardiovasculares

A elevação plasmática de LDL, colesterol, e triglicérides e a redução de HDL e o aumento de triglicérides em alterações metabólicas crônicas caracterizam a

dislipidemia (KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013). A dislipidemia está diretamente relacionada com o desenvolvimento de disfunções cardiovasculares e à alta mortalidade (KLOP; ELTE; CABEZAS, 2013).

As doenças cardiovasculares podem ser provocadas por fatores como as dislipidemias, causadas pelo aumento da ingestão de lipídios na dieta (CARVALHO-FILHO et al., 2007). Estas podem influenciar processos do metabolismo de ácidos graxos, assim como a modulação do tecido adiposo e produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre outros fatores humorais (CARVALHO-FILHO et al., 2007).

Compreender como o SRA se comporta frente à dislipidemia torna-se uma estratégia interessante para se compreender como alterações morfológicas na estrutura cardiovascular ocorrem em situações de sobrecarga lipídica e lipoproteica. O colesterol estimula a expressão de diversos componentes do SRA (PUTNAM et al., 2012). Nesse contexto, a produção de Ang II e a expressão de AT1r podem ser induzidas pela ação do colesterol (Van Linthout *et al.*, 2009).

Outros dados publicados sugerem que, na obesidade, o tecido adiposo pode exercer um controle importante sobre a pressão arterial, de modo a produzir componentes do SRA e aumentar as suas ações locais e sistêmicas (THATCHER et al., 2009). Além disso, a inibição de componentes do SRA como o AT1r pode atuar no controle e na inibição do colesterol, uma vez que foi constatado que a administração de bloqueadores de AT1r podem reduzir os níveis de colesterol (VAN LINTHOUT et al., 2009).

1.6 Obesidade e ação hormonal inflamatória

A obesidade geralmente é definida como excesso de tecido adiposo. Em humanos os lipídios essenciais e não essenciais são estocados na forma de triglicerídeos (triacilgliceróis) em adipócitos (OGDEN et al., 2007).

A obesidade pode ser classificada como um distúrbio metabólico relacionado a um balanço positivo entre o consumo e o gasto energético (OGDEN et al., 2007). Por se tratar de uma doença crônica e multifatorial, esta pode abranger alterações consideráveis de ordens genética, fisiológica, comportamental, social e psíquica (WANDERLEY et al., 2010).

A obesidade é desencadeada por fatores exógenos relacionados com o aumento do consumo alimentar de alta caloria, em grande parte de produtos

industrializados. Este aumento de consumo alimentar, associado à diminuição da atividade física, pode ter um efeito preponderante, se comparado com as disfunções endócrinas, genéticas e metabólicas (BALL et al., 2003; BOUCHARD, 2000; DAMASO, 2003). Além disso, o desenvolvimento e a manutenção da obesidade estão associados diretamente com a ação hormonal. A participação de hormônios como leptina, grelina, neuropeptídeo Y, peptídeo YY, hormônio liberador de corticotrofina (CRH), arginina vasopressina (AVP) e catecolaminas, em sua grande parte, auxiliam nos processos de alteração metabólica, ganho de peso e aumento da adiposidade visceral (PEEBLES, 2008).

A leptina produzida em adipócitos possui cerca de 16 KDa, e atua no metabolismo do tecido adiposo, através da inibição da lipogênese e estimulando a lipólise. Em camundongos, o gene que codifica a leptina é o gene *OB* (SCHWARTZ; BASKIN, 2013). No sistema nervoso central (SNC), as ações da leptina no controle de respostas antiobesidade, apetência, ativação do sistema nervoso simpático e pró-gonadotróficas ocorrem via receptor Ob-Rb. Também é capaz de atuar na homeostase pressórica, tanto numa resposta pressora de ativação do sistema nervoso simpático como depressora, estimulando produção de óxido nítrico (SCHWARTZ; BASKIN, 2013).

Outra importância a ser ressaltada está no fato de o tecido adiposo possuir funções ativas na produção de hormônios e precursores hormonais, além de produzir citocinas, como interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Nesse sentido, é capaz de produzir o angiotensinogênio e Ang II de modo a aumentar o tônus vascular, a volemia e a frequência cardíaca (THATCHER et al., 2009).

1.7 Ação da Ang II na produção do TGF- β

A Ang II produzida na parede vascular (DZAU; KRIEGER; HUTCHINSON, 1995) é capaz de gerar hiperplasia da íntima independentemente de efeitos hemodinâmicos ou neurohumorais (NAFTILAN, 1994; ROSS, 1999). O desenvolvimento de fisiopatologias como a aterosclerose, hipertensão e restenose, em consequência da estimulação trófica da parede vascular, promovida principalmente por ação da Ang II, provoca alterações estruturais vasculares

causadas por modificações na MEC vascular (MULVANY, 1996; NAFTILAN, 1994; ROSS, 1999).

No entanto, subsequentemente, rearranjos nas células vasculares, principalmente, nas musculares lisas por ação em receptores específicos, iniciam a modificação da composição estrutural da MEC (remodelamento), que conduz a alterações na túnica média do vaso e no diâmetro luminal, no processo denominado “remodelamento vascular” (MULVANY, 1996)

Além disso, a Ang II estimula a ativação de programas de transcrição para diversos genes de proteínas e moléculas que levam a modificações na função vascular, entre os quais metaloproteinases de matriz (MMPs), proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), molécula de adesão celular vascular (V-CAM), fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) e inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), interleucinas, TNF- α e fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β), entre outros (DZAU; LOPEZ-ILASACA, 2005).

A superfamília do TGF- β consiste de uma diversa gama de proteínas que regulam muitos processos fisiológicos (RUIZ-ORTEGA et al., 2007). O TGF- β é uma proteína com ações multifuncionais, participando da regulação da divisão celular, diferenciação, migração, adesão celular, produção de matriz extracelular, entre outros, estando também envolvido com diversas patologias, inclusive as doenças cardiovasculares (RUIZ-ORTEGA et al., 2007). É importante ressaltar que o TGF- β é sintetizado como proteína inativa, tendo em sua estrutura o peptídeo associado à latência (LAP). Esta proteína interage com proteínas de ligação do TGF- β latente (LTBP), que o ancoram à matriz extracelular. Este TGF- β é ativado pela clivagem proteolítica por plasmina, microambiente ácido e metaloproteinases de matriz (MMP-2 e 9), entre outros (ANNES; MUNGER; RIFKIN, 2003; GIBBONS; PRATT; DZAU, 1992).

Considerando que o aumento de TGF- β se dá de forma rápida em resposta à Ang II, este processo deve envolver além da transcrição gênica e síntese protéica, a liberação de proteína já sintetizada (SOUZA-OLIVEIRA, 2010). O TGF- β é sintetizado, secretado e ancorado à matriz extracelular, devendo ser liberado em resposta a um estímulo. Neste sentido, pode-se considerar que a plasmina é um importante fator de liberação do TGF- β latente (KHALIL *et al.*, 1996) e que a Ang II age sobre o balanço fibrinolítico vascular (NAKAMURA et al., 2000). Assim, postula-

se que a forma pela qual a Ang II leva à rápida liberação de TGF- β se daria pela sua ação sobre a via fibrinolítica.

1.8 Estresse oxidativo e ação da mieloperoxidase

A mieloperoxidase, uma heme-proteína que pode ser produzida por neutrófilos ativados, macrófagos e monócitos dentre outro tipos celulares, pode mediar uma peroxidação lipídica capaz de promover a produção de compostos reativos que atuam sobre o endotélio (DAVID SCHMITT et al., 1999).

Figura 3. Esquema de lesão vascular induzida pela ação da MPO

Esquema de lesão vascular induzida pela ação da MPO. A peroxidação lipídica mediada pela MPO é capaz de gerar produtos reativos ao endotélio como LDLox, HDLox e $\cdot\text{NO}_2$, os quais podem promover respostas lesivas sobre a parede do vaso. Uma característica em processos inflamatórios é a peroxidação de lípidos e concomitante formação de produtos bioativos de peroxidação lipídica (Figura 3).

Espécies de radicais difusíveis formados pela MPO podem participar da peroxidação de lipídios como dióxido de nitrogênio (NO_2), um produto do sistema peroxidase- H_2O_2 -nitrito (PRYOR et al., 1983; ZHANG et al., 2002).

A produção de $\bullet\text{NO}_2$ é capaz de nitrar resíduos de proteínas, enquanto a formação de peroxinitrito (ONOO^-) um oxidante potente, pode gerar um estímulo lesivo nos tecidos (GOSS et al., 1999). O acúmulo destes agentes altamente reativos pode desencadear ativação endotelial, bem como a ativação e recrutamento de células do sistema imune desencadeando um processo inflamatório deletério sobre o vaso (FENYO; GAFENCU, 2013; ULLEVIG; KIM; ASMIS, 2013).

Um fator importante para a ativação de células mielóides em processos inflamatórias envolvendo mediadores lipídicos e a LDL oxidada (LDLox). A formação de LDLox depende de fatores tais como acúmulo de LDL e catálise por via de metais de transição (Cu^{2+} , Fe^{3+}), formando radicais peroxil e alcoxil (BUETTNER, 1993; DARLEY-USMAR; HALLIWELL, 1996). A LDLox é um elemento importante na ativação de macrófagos em respostas inflamatórias vasculares. Cabe ressaltar que um certo grau de peroxidação é importante para eliminação de um acúmulo LDL da parede vascular via ação de monócitos (DAVID SCHMITT *et al.*, 1999)

2 JUSTIFICATIVA

Como apresentado anteriormente, o consumo alimentar com grande carga lipídica pode promover grandes alterações fisiológicas e metabólicas, induzindo respostas inflamatórias deletérias sobre o sistema cardiovascular. Desta forma, a dieta hiperlipídica pode modificar o funcionamento cardiovascular e representar um risco para o desenvolvimento do enrijecimento arterial e patologias cardiovasculares. Assim, é de grande importância melhor compreender os efeitos que a dieta hiperlipídica tem sobre o sistema cardiovascular, através do estudo da atividade de componentes do SRA como a ECA. O consumo de dieta hiperlipídica é considerado um fator desencadeante de respostas inflamatórias, mediadas por células mononucleares e polimorfonucleares via estresse oxidativo. Além disso, o consumo da dieta hiperlipídica pode ser um fator indutor de processos de remodelamento vascular aórtico com a participação do TGF- β .

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica:

- 1) O efeito sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca e o metabolismo lipídico e glicêmico,
- 2) O efeito sobre a morfologia das artérias cardíacas e da aorta;
- 3) A participação da MPO como marcador inflamatório nos tecidos cardíaco e aórtico;
- 4) A participação do TGF- β no remodelamento vascular e na deposição de fibras de colágeno em aortas;
- 5) A participação do sistema renina-angiotensina, via ação da ECA no remodelamento vascular e na deposição de fibras de colágeno em aortas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os ensaios foram realizados em camundongos isogênicos machos da linhagem C57Bl/6, com 8 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Este projeto foi aprovado pela CEUA do ICB/USP.

4.2 Dieta controle e dieta hiperlipídica

Buscando um resultado mais fidedigno e o balanceamento energético ideal das dietas controle e hiperlipídica, foram utilizadas as rações desenvolvidas no laboratório de Hematologia Clínica chefiado pela Prof^a Dr^a Primavera Borelli, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências. Esta dieta foi desenvolvida de forma a suprir as necessidades energéticas dos animais, visando evitar a carência nutricional decorrente do excesso de lipídios na alimentação. Tanto a dieta controle como a hiperlipídica foram desenvolvidas no Laboratório da Prof^a Primavera, baseando-se em estudos com dieta hiperlipídica em ratos (JACOB et al., 2013).

Para elaboração da dieta controle foram utilizados: amido, sacarose, caseína (14%), óleo de soja (4%), celulose, L-cistina, bitartarato de colina, tertibutilhidroquinona, mistura salpínica (ácido bórico; carbonato de cálcio; carbonato de cobre; carbonato de manganês; carbonato de níquel; carbonato de zinco; citrato de potássio; citrato férrico; cloreto de lítio; cloreto de sódio; fluoreto de sódio; fosfato monopotássico; iodato de potássio; metassilicato de sódio; óxido de magnésio; paramolibdato de amônia; sacarose; selenato de sódio; sulfato de cromo; sulfato de potássio; vanadato de amônia) e mistura vitamínica (vitamina B12; vitamina B6; bitartarato de colina; vitamina; vitamina D; vitamina E; vitamina K; ácido p-aminobenzoico; niacina; biotina; ácido fólico; ácido ascórbico; ácido nicotínico; inositol; sacarose q.s.p). Para a elaboração da dieta hiperlipídica, foram utilizados os mesmo componentes da ração controle, mas com alterações nas quantidades de óleo de soja (5,3%) e caseína (18,7%) e acréscimo de gordura animal suína (30%).

Tabela 1. Composição das Rações (g/Kg ração)

Constituintes	Controle (g)	Hiperlipídica(g)
Amido q.s.p.	640,69	193,38
Sacarose	100	133,56
Caseína	120	186,98
Óleo de Soja	40	53,42
Banha de porco	--	300
Celulose	50	66,78
Mistura salínica	35	46,74
Mistura vitamínica	10	13,36
L-Cistina	1,8	2,4
Bitartarato de Colina	2,5	3,34
Tert-butilhidroquinona	0,01	0,04

4.3 Protocolos das dietas

Foram utilizados 14 camundongos no grupo mantido com dieta controle, enquanto para a dieta hiperlipídica foram utilizados 16 camundongos. Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada entre 22 e 24 °C com as rações e água administradas *ad libitum*. Ambos os tratamentos tiveram a duração de oito semanas, sendo que cada animal foi pesado semanalmente. Antes dos procedimentos de eutanásia e coletas de sangue, os animais foram submetidos ao jejum prévio de seis horas, para viabilizar as análises séricas glicêmicas, bem como o perfil lipídico.

4.4 Avaliações indiretas da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

Ao final do tratamento, foram feitas as medidas de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda. É importante ressaltar que na semana anterior à medida, os animais foram adaptados ao sistema. As variáveis hemodinâmicas foram avaliadas para verificar se os tratamentos modificam ou não a pressão arterial, importante fator que atua na estrutura do sistema

cardiovascular. As medidas de FC e PAS foram obtidas através do método de esfigmomanômetro de cauda, onde o camundongo é colocado na caixa restritora (Figura 4), a qual é aquecida para promover a vasodilatação na cauda do mesmo. O esfigmomanômetro adaptado para camundongos é colocado na cauda do animal e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal, sendo a obstrução do fluxo diminuída lentamente, até a captação dos primeiros picos de pressão arterial sistólica.

Figura 4. Sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos

Esquema simplificado do sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos. Um manguito específico para cauda de camundongo é colocado na região proximal da cauda, permitindo a oclusão da artéria caudal quando insuflado. A presença de um transdutor de pressão junto ao manguito permite a detecção da pressão caudal quando o manguito é desinsuflado. Os sinais captados são processados em sistema específico para esta finalidade.

Os picos de PAS foram captados pelo *Sistema BP-2000 series II*, que consiste de um transdutor eletromagnético localizado na cauda do animal e conectado a um amplificador, que repassa o sinal para um conversor analógico-digital, registrando, assim, os valores em tempo real no microcomputador. Os valores obtidos foram analisados pelo programa *BP-2000 Blood Pressure Analysis*. Para a determinação da pressão arterial caudal e frequência cardíaca de repouso foram consideradas as médias aritméticas de dez registros bons realizados em um mesmo dia, para cada animal. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão do Instituto de Coração (InCor – HC.FMUSP), sob supervisão da Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen.

4.5 Visualização do tecido adiposo in vivo e quantificação

Foram captadas imagens por raio-X dos animais submetidos as dietas para análise do tecido adiposo de cada grupo, através do método de imageamento utilizando o *In-Vivo Imaging System FX PRO*, no CENTRO DE FACILIDADES PARA PESQUISA (CEFAP) – ICB/USP. As imagens obtidas nesta análise foram utilizadas nas quantificações dos coxins de tecido adiposo retroperitoneal e periepípidimal de cada um dos animais utilizando os programas *ICY* e *Image J* (versão 1.32j domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.6 Eutanásia

Ao final de cada período de tratamento os animais foram eutanasiados por dose letal de quetamina (180 mg/Kg), xilasina (20 mg/Kg) e heparina sódica (50 U por animal) via intraperitoneal. Após a eutanásia, foram medidos os comprimentos naso-anal de cada animal para avaliação biométrica.

4.7 Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada através da punção cardíaca nos camundongos previamente anestesiados. Em seguida, foi separando o soro através do método de centrifugação a 3000 rpm, por 10 min a 4 °C. As alíquotas de soro foram armazenadas no congelador à temperatura de -80 °C, para posterior análise de parâmetros bioquímicos.

4.8 Coletas de tecidos

Foram realizadas as perfusões com solução de PBS 1X através da punção do ventrículo direito, coletando-se em seguida a aorta e o coração (o qual foi pesado) foram coletados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados à temperatura de -80 °C. Foram realizados posteriormente nos tecidos cardíacos e aórticos coletados, ensaios de detecção proteica para ECA, TGF- β através da técnica de *immunoblotting*, além de ensaios enzimáticos para ECA e MPO.

Para coleta de tecidos para histologia, novos grupos de animais foram submetidos ao mesmo protocolo de perfusão sendo ainda perfundidos com solução de formol a 4% tamponado (tampão fosfato, pH 6,8-7,2, 0,1 M). Foram coletados fragmentos da aorta torácica, sendo estes fragmentos mantidos em formol 4% tamponado por 24 horas; em seguida, os fragmentos foram colocados em cassetes plásticos e colocados em álcool etílico a 70% até o processamento em aparelho histotécnico.

4.9 Avaliações do perfil lipídico sérico

As dosagens séricas de colesterol total, HDL-colesterol e triglicérides foram realizadas com kits comerciais (Labtest Diagnóstica S/A, Minas Gerais, Brasil). Para as dosagens de colesterol total foram utilizados cerca de 10 µL de soro. Os ensaios de dosagens séricas foram realizados no laboratório de Fisiofarmacologia Metabólica Cardiovascular e Renal do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Presbiteriana Mackenzie, sob supervisão das Profas. Dras. Patrícia Fiorino e Vera Farah. Brevemente, o princípio empregado neste ensaio envolveu as seguintes reações:

ésteres de colesterol $\rightarrow$ *colesterol* + *ácidos graxos* (via ação da *colesterolesterase*)

colesterol + $O_2 \rightarrow$ *colest-4-en-ona* + H_2O_2 (via ação da *colesterol oxidase*)

$2H_2O_2$ + *fenol* + *aminoantipirina* $\rightarrow$ *antipirilquinonimina* + $4H_2O$ (via ação da *peroxidase*)

Os ésteres de colesterol contidos no soro foram hidrolisados pela *colesterolesterase* a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre foi oxidado pela *colesterol oxidase* a *colest-4-en-ona* e peróxido de hidrogênio. Na presença de *peroxidase* e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina foram oxidados formando a *antipirilquinonimina* que possui absorbância máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final foi diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Para as dosagens séricas de HDL-colesterol foram utilizados cerca de 50 µL de soro. Neste procedimento as lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e os quilomícrons são quantitativamente precipitadas via ação de ácido fosfotugstático e cloreto de magnésio seguido de

centrifugação. Após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL) é determinado no sobrenadante através da ação das enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase conforme as reações descritas na determinação do colesterol total.

Para as dosagens séricas de triglicérides foram utilizados cerca de 100 µL de soro. Neste ensaio ocorreram as seguintes reações para determinação da concentração de triglicérides:

triglicérides → *glicerol* + *ácidos graxos* (via *lipoproteína lipase*)

glicerol + *ATP* → *glicerol-3-fosfato* + *ADP* (via *glicerolquinase*)

glicerol-3-fosfato + *O₂* → *dihidroxiacetona* + *H₂O₂* (via *glicerol-3-fosfato oxidase*)

2H₂O₂ + *4 aminoantipirina* + *4clorofenol* → *quinoneimina* + *4H₂O* (via *peroxidase*)

A lipoproteína lipase promove a hidrólise de triglicérides liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerol quinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorreu uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quineimina que possui absorvância em 505 nm. Novamente, a intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triglicérides na amostra. Para determinação das concentrações séricas de LDL e VLDL utilizamos a fórmula de *Friendewald*:

$\text{Colesterol total} = \text{HDL} + \text{LDL} + \text{VLDL}$

$\text{VLDL} = \text{triglicérides} / 5$

4.10 Avaliações do perfil glicêmico sérico

A concentração sérica de glicose foi quantificada em 10 µL de soro com o kit *Glicose PAP Liquiform* (Labtest Diagnóstica S/A, Minas Gerais, Brasil). O princípio empregado neste método é o seguinte:

glicose + *O₂* + *H₂O* → *ácido glucônico* + *H₂O₂* (via *glicose oxidase*)

2H₂O₂ + *4-aminoantipirina* + *fenol* → *antipilquinonimina* + *4H₂O* (via *peroxidase*)

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose formando ácido glucônio e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. A intensidade de coloração foi medida através de absorbância entre 490 e 520 nm.

4.11 Processamentos de tecidos, microtomia e preparo das lâminas

As aortas e corações coletados foram acondicionados em cassetes mantidos em álcool etílico a 70% foram processadas em aparelho histotécnico num ciclo total de 8 horas onde se realizou a desidratação, diafanização e parafinização dos tecidos com *Paraplast®*. Os fragmentos da aorta descendente torácica e ventrículos do coração foram incluídos em *Paraplast®* e posteriormente cortados em micrótomo (*Microm HM200 ERGOSTAR*). Foram feitos cortes de 5 µm de espessura a partir do segmento descendente da aorta torácica e dos ventrículos do coração, sendo estes cortes dispostos em lâminas histológicas. Estas lâminas foram coradas com Picrossirius para análise morfométrica. Nos cortes de aorta corados com picrossirius foi feita ainda a visualização e quantificação de fibras colágenas coradas com picrossirius, e também coradas com *Weigert-Van Gieson* para visualização e quantificação de fibras elásticas e fibras colágenas.

4.12 Avaliações da rede elástica e da rede colágena aórtica por Weigert-Van Gieson

Para esta análise foi usada a coloração de *Weigert-Van Gieson*, que ressalta a presença das lamelas elásticas e fibras colágenas. Desta forma, foi possível estabelecer se os tratamentos levam a uma alteração da quantidade de lamelas elásticas e conseqüentemente da disposição e número de células musculares lisas. Desta forma, podemos avaliar um possível remodelamento vascular foi acompanhado por uma adaptação correspondente do sistema colágeno e elástico.

Resumidamente a coloração foi efetuada utilizando os seguintes passos:

- Depois de desparafinizados e reidratados em água destilada por 10 minutos, os cortes foram corados com hematoxilina férrica de Weigert por 30 segundos;

- Em seguida os cortes foram lavados em água destilada por 3 minutos;
- Na sequência cada corte foi imerso no corante fucsina-resorcina por 25 minutos;
- Em seguida os cortes foram diferenciados em álcool etílico a 95% por 3 minutos ;
- Depois desta etapa, os cortes foram lavados em água destilada por 3 minutos;
- O próximo passo foi a coloração de Van Gieson por 1 minuto e lavagem em água destilada por 3 minutos;
- Na sequência cada lâmina foi mergulhada duas vezes em cubas contendo álcool etílico nas ordens de concentração de 95%, 95%, 100%, 100%, 100%;
- Depois da etapa anterior as lâminas foram deixadas em cuba contendo xilol por 10 minutos. Esta etapa foi repetida três vezes para cada lâmina
- Por fim as lâminas são colocadas em uma cuba com xilol rapidamente até a montagem com *Permount®* e lamínula.

Com as lâminas coradas, foi possível através do microscópio Zeiss *AXIO Imager.A2*, fazer uma análise de fibras colágenas e fibras elásticas em microscopia de luz comum. Foram analisados 3 cortes de cada tecido aórtico dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica (ambos com n=5).

A quantificação das fibras elásticas e colágenas foi realizada usando o programa *ICY*, utilizando o aplicativo *KMeans Color Quantization*. Os valores foram expressos em gráfico a partir da relação entre a área de fibra colágena e a área de fibra elástica.

4.13 Avaliações da rede colágena vascular por picrossírius

As alterações na estrutura ou composição da matriz extracelular foram avaliadas através de colorações específicas para fibras colágenas. A visualização das fibras colágenas foi feita após coloração de picrossírius, sob luz polarizada. A coloração pelo picrossírius é um método muito eficiente e simples para localizar e caracterizar o colágeno presente em diferentes tecidos, permitindo observar as relações existentes entre morfologia e histoquímica (Junqueira et al., 1991). Este método foi utilizado para avaliar deposição perivascular de fibras colágenas dos vasos estudados.

A coloração com picrossírius (0,1 g de Sirius Red adicionado a 100 ml de solução saturada de ácido pícrico) pode ser descrita brevemente nos seguintes passos:

- Depois da hidratação dos cortes já desparafinizados, colocou-se as lâminas por 1 hora no corante Picrossírius;
- Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente por 3 minutos;
- Na sequência cada lâmina foi mergulhada duas vezes em cubas contendo álcool etílico nas ordens de concentração de 95%, 95%, 100%, 100%, 100% até chegar à cuba com álcool etílico + xilol (na concentração de 1:1);
- Em seguida as lâminas foram colocadas na cuba com álcool+xilol 1:1 por 5 minutos;
- Depois da etapa no álcool etílico + xilol as lâminas foram deixadas em cuba contendo xilol por 10 minutos. Esta etapa foi repetida três vezes para cada lâmina
- Por fim as lâminas são colocadas em uma cuba com xilol rapidamente até a montagem com *Permout®* e lamínula.

4.14 Quantificação de fibras colágenas usando microscopia de luz polarizada

Com as lâminas de aorta coradas com picrossírius, foi possível através do microscópio Zeiss *AXIO Imager.A2*, captar as imagens de fibras colágenas a partir do recurso de polarização. Tal análise tem como objetivo avaliar a deposição de fibras finas e espessas de colágeno na matriz extracelular perivascular em aortas, além de avaliar como estas fibras se dispõem no vaso em função das dietas. A classificação do colágeno nos cortes corados com picrossírius na luz polarizadas foi feita de acordo com observações feitas por Montes e Junqueira (1991):

Tabela 2. Classificação de fibras colágenas coradas com Picrossírius em luz polarizada

<i>Tipo de Fibra de Colágeno</i>	<i>Característica Observada na Polarização</i>
Fibras de Colágeno Delgadas	Fibras individuais fracamente refringentes, de cor amarelo-esverdeado a verde.
Fibras de Colágeno Espessas	Feixe de fibras, fortemente refringentes, de cores amarela a vermelha.

A quantificação das fibras colágenas espessas e delgadas foi realizada usando o programa *ICY*, e utilizando o *plugin KMeans Color Quantization*. Os valores foram expressos em um gráfico, o qual mostra as áreas de fibras colágenas delgadas e de fibras colágenas espessa na túnica adventícia. Foram analisados 3 lâminas de cada animal em cada um dos grupos, sendo que para cada lâmina foi feita a quantificação das fibras colágenas em 3 cortes distintos da aorta, sendo os valores finais de cada quantificação o resultado da média total das medidas.

A análise da ondulação e orientação das fibras elásticas foi realizada no programa *ImageJ*, utilizando o *plugin OrientationJ* (PROVENZANO et al., 2008; SCHRIEFL et al., 2012). A ideia de se avaliar o nível de organização ou desorganização das fibras de colágeno surgiu a partir dos estudos citados, mostrando diferenças de entropia das fibras. Se pensarmos que uma menor entropia significa uma maior organização das fibras, podemos considerar que estas atuam de forma mais coordenada oferecendo a resistência necessária à parede vascular. Por outro lado, se pensarmos que uma maior entropia resulta de grande desorganização na disposição das fibras de colágeno, pode-se pensar que será necessário um trabalho maior sobre estas para obter-se o mesmo grau de distensão vascular, levando a um enrijecimento da parede vascular.

Figura 5. Imagem representativa das quantificações de ondulação das fibras colágenas na túnica adventícia realizada no programa *ImageJ*

Imagem representativa das quantificações de ondulação das fibras colágenas na túnica adventícia – aumento de 400X em luz polarizada, formato *RGB*. Os quadros em amarelo representam as regiões de interesse analisadas, enquanto, as elipses em vermelho representam as regiões demarcadas pelo *plugin OrientationJ* para análise das fibras colágenas analisadas.

Assim, as medidas de ondulação foram quantificadas a partir do grau de desorganização das fibras colágenas, medindo-se a entropia de cada campo demarcado na fotomicrografia. Para cada segmento das fibras colágenas fotomicrografadas em aumento de 400X, foram realizadas 5 medidas de entropia (Figura 5).

Em cada corte da aorta foram analisados 4 segmentos distintos do corte transversal da aorta, sendo os valores finais de cada quantificação o resultado da média total das medidas.

4.15 Atividade enzimática da ECA

O ensaio de atividade enzimática da ECA foi realizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da USP, sob supervisão do Prof. Dr. José Eduardo Krieger. Os tecidos cardíacos e aórticos congelados foram macerados cada um em tampão Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM pH 7,0. Para cada 100 mg de tecido foi utilizado 1 mL de tampão.

Depois de homogeneização dos tecidos aórticos, cada homogenato foi centrifugado por 15 minutos a 4°C em 3000 rpm. Após esta etapa foi coletado o sobrenadante. Em seguida foram realizadas as dosagens de proteína total do sobrenadante o reagente de Bradford.

A atividade da ECA foi medida pelo ensaio de registro contínuo a cada 1 minuto usando um peptídeo fluorescente com a sequência Abz-FRK(Dnp)P-OH (Abz= orto-aminobenzoil, Dnp = dinitrofenil). A atividade enzimática foi seguida continuamente num fluorímetro medindo a emissão de fluorescência no comprimento de onda λ_{em} = 420 nm e λ_{ex} = 320 nm. Cerca de 5 μ L de sobrenadante para cada uma das amostras foram incubados com 3 μ L do substrato Abz (1mM) e 197 μ L do tampão Tris-HCl 0,1 M contendo NaCl 50 mM e 10 mM ZnCl₂ pH 7,0. Como controle positivo foi utilizado sobrenadante extraído de tecido pulmonar de camundongo.

Para comprovar que a atividade enzimática era realizada pela ECA, foram feitas medições da atividade utilizando-se como inibidor o Captopril (0,5 μ M). A atividade da ECA foi expressa em Unidade de Fluorescência / μ g de tecido. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.16 Avaliação de expressão proteica de ECA e TGF- β por Immunoblotting

Este ensaio também foi realizado no Laboratório do Prof. José Eduardo Krieger, sendo utilizados corações e aortas coletados de cada um dos grupos das dietas. As proteínas analisadas foram a ECA e TGF- β . A proteína usada como padrão normalizador em ambos os tecidos foi a β -tubulina. Para a realização da avaliação foram preparados novamente os grupos experimentais, já que nesta situação é necessário que os corações sejam coletados após a perfusão com PBS 1X e sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi feita a extração das proteínas, lisando-se o tecido em meio RIPA (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 25 mM Hepes pH 7,5, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1% Triton X-100, 1:100 coquetel de inibidores de proteases) com agitação por 30 minutos à 4 °C.

Os homogenatos foram centrifugados a 10000XG por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas utilizando o reagente de Bradford diluído em água destilada na proporção de 1:5. Foram utilizados 190 μ L desta solução para dosagem de 10 μ L de amostra previamente diluída 30 vezes, para detecção de proteína total por absorbância a 595 nm pelo kit *DC Protein* (BioRad).

As amostras foram colocadas em tampão de amostra (H_2O ; Tris-HCl 200mM; pH 6,8; glicerol 40%; sulfato dodecil de sódio 8%; DDT; azul bromofenol a 0,4%) a 100°C por 5 min, sendo submetidas em seguida à eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando o sistema *Mini-Protean Tetra-ProteanCell* (Bio-Rad®). Utilizamos o marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standart Kaleidoscope* (Bio-Rad®) para verificar o peso das proteínas.

Após a eletroforese transferimos as proteínas para membrana de nitrocelulose *Hybond-C Extra* (GE Healthcare) em meio de transferência (0,025 M TRIS, 0,192 M GLICINA, 0,1% SDS, 20% METANOL) utilizando o sistema *Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad®).

A membrana então foi lavada em solução de TBS-T 1X 3 vezes (5 minutos cada lavagem). Em seguida a membrana foi bloqueada com albumina sérica bovina (BSA) a 5% por 30 hora, depois lavada 3 vezes em TBS-T e depois incubada *overnight* com anticorpos (Anti ECA, Santa Cruz sc-1173 e concentração 1:500, peso molecular deste marcador é de 41-45 kDa; Anti TGF- β Santa Cruz sc-8104 e

Anti β tubulina, Santa Cruz sc-9104 e concentração 1:1000, peso molecular deste marcador é de 55 kDa). Em seguida fez-se a lavagem da membrana em TBS-T seguido, e incubação do anticorpo secundário *anti-rabbit* (goatanti-rabbitIgG-HRP sc-2030) por 1 hora em temperatura ambiente. Após nova lavagem foi feita a exposição com *ECL WB DetectionReagents* (GE Healthcare) e revelação no equipamento *Image Quant LAS 4000 mini* (GE Healthcare).

As bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do software *Image J* onde a densidade óptica de cada banda foi aferida. Inicialmente, o sistema de análise calcula a densidade óptica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar cada banda (uma de cada vez) visível, não devendo ser alterada, quando se passa a analisar uma outra banda. Os valores foram expressos à partir da densidade dos pixels das bandas marcadas para β -tubulina (padrão normalizador), ECA e TGF- β . Os valores para quantificação da expressão proteica das amostras de cada um dos grupos foram determinados da área da banda para proteína-peptídeo alvo em relação a área da banda da β -tubulina.

Os valores obtidos na quantificação de ECA e TGF- β foram expressos em gráficos de barras em porcentagem em relação ao grupo dieta controle, onde a densidade óptica média relativa das proteínas marcadas no grupo controle é considerado igual a 100%.

4.17 Atividade enzimática da mieloperoxidase

O ensaio foi realizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração (InCor) da Faculdade de Medicina da USP, sob supervisão do Prof. Dr. José Eduardo Krieger. Este ensaio foi empregado como medida indireta de ação leucocitária mediadora de estresse oxidativo com potencial inflamatório. Assim, para esta análise foram utilizados novamente os homogenatos obtidos a partir tecidos cardíacos e aórticos utilizando o mesmo protocolo de extração para os ensaios de atividade da ECA.

A atividade da MPO foi mensurada pela captação contínua usando o reagente *Amplex® Ultrared*. A atividade enzimática foi seguida continuamente a cada 1 minuto num fluorímetro através da emissão de fluorescência nos comprimentos de onda em λ_{em} = 530 nm e λ_{ex} = 590 nm. Cerca de 50 μ L de sobrenadante para cada

uma das amostras foram incubados com 50 μ L do substrato Amplex® (5 μ L de H_2O_2 5 mM, 20 μ L de *Amplex®Ultras*, 976 μ L de PBS 1X). Para comprovar que a atividade enzimática era realizada pela MPO, foram feitas medições da atividade utilizando-se como inibidor o composto azida de sódio (10 μ M). A atividade da MPO foi expressa em unidade de fluorescência/ μ g de tecido. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.18 Detecções de ECA e TGF- β por imuno-histoquímica

O método de imuno-histoquímica (IHQ) foi empregado para a detecção e localização tecidual de ECA e TGF- β em cortes de aorta de camundongos submetidos às diestas.

O método de imuno-histoquímico tipo A-B-C (estreptoavidina – biotina – peroxidase) foi utilizado neste ensaio. Neste método, primeiramente foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3% por 15 minutos. Os tecidos da aorta torácica decantando com 5 μ m foram incubados em câmara úmida, de um dia para outro, a 4 °C com anticorpos primários (Ac 1°), diluídos em albumina de soro bovino (BSA, Bovine Serum Albumin, Sigma®) a 2%.

Para a marcação da ECA (ACE goat polyclonal C-20, SC-12187; Santa Cruz Biotechnology, Inc.®) foi usado anticorpo policlonal produzido em cabra na diluição de 1:500. O controle negativo foi realizado omitindo-se o anticorpo primário e colocando-se somente o substrato (BSA), no primeiro corte de cada lâmina histológica. Na sequência foram incubados com imunoglobulina biotinilada anti-cabra (Vector®, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1000, durante 30 minutos. Em seguida foi acrescentada a estreptavidina usando-se o kit *ABC Vectastain Elite* (Vector®, Burlingame, EUA) durante 30 minutos.

A revelação da reação IHQ foi feita usando-se a 3,3 diaminobenzidina (DAB) como agente cromógeno (Kit DAB Vector®). A contra-coloração foi feita com hematoxilina, seguida pela montagem das lâminas com Clearmount TM (Zymed® Laboratories).

Para amarração do TGF- β (TGF-beta 1 rabbit polyclonal SC-146; Santa Cruz Biotechnology, Inc.®) foi realizado antes a recuperação antigênica na qual foi utilizado tampão citrato com pH = 6,0. As lâminas foram colocadas em banho-maria a 97°C. Após a recuperação antigênica ser realizada e sua temperatura normalizada (temperatura ambiente), deu-se início a técnica de IHQ propriamente dita. Foi usado

o anticorpo primário anti TGF- β (TGF-beta 1 Santa Cruz Biotechnology, Inc.®) na diluição de 1:500 em BSA a 5% e as lâminas incubadas *overnight* a temperatura de 4 °C.

As lâminas passaram pelo mesmo processo padronizado de IHQ para ECA, exceto pelo anticorpo secundário que no caso foi usado anti-coelho (goat anti-rabbit-Vector Laboratories®) na diluição de 1:1000 em PBS 1X durante 45 minutos a temperatura ambiente, além disso para o uso da estreptoavidina, foi utilizado o kit *ABC Vectastain Elite* (Vectastain®), feita a revelação da imunomarcação com DAB e contra-coloração com hematoxilina.

4.19 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos foram avaliados como média $\pm$ desvio-padrão. O valor de n em cada experimento correspondeu ao número de camundongos utilizados. Os gráficos e as análises estatísticas foram feitos utilizando o programa *GraphPadPrism 5®*. A análise estatística empregada foi o teste “t” não pareado com correção de *Welch*, utilizado para determinar se houveram diferenças nos fenômenos observados entre os grupos dieta controle e dieta hiperlipídica. Para a curva de pesagem corpórea dos animais ao longo do tempo, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dois caminhos. Para todas as análises foram adotados o nível de significância de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Peso corpóreo, peso do relativo do coração e porcentagem de tecido adiposo

O monitoramento do peso corpóreo dos camundongos permitiu avaliar se o tipo de dieta ministrada em cada grupo influenciaria no ganho de peso no período de 8 semanas. Na 8ª semana, houve diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$), sendo a média de peso do grupo dieta controle foi de $30,69 \pm 3,29$ g e a do grupo dieta hiperlipídica foi de $35,12 \pm 4,11$ g (figura 6).

Figura 6. Curva temporal do peso corpóreo dos camundongos submetidos às dietas

Gráfico da curva de peso corpórea relacionando o grupo controle e o grupo da dieta hiperlipídica. Houve diferenças significativas entre os grupos na 8ª semana. $*(p \leq 0,05)$. Dieta Controle $n = 14$, Dieta Hiperlipídica $n = 16$.

Figura 7. Relação entre peso do coração e comprimento naso-anal dos camundongos

Gráfico da relação entre peso do coração (mg) e comprimento naso-anal, dos camundongos submetidos as dietas. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados. Dieta controle n=4, dieta hiperlipídica n=8.

Não houve diferença significativa entre os grupos dieta controle e dieta hiperlipídica, para as medidas do peso do coração corrigido pelo comprimento naso-anal de cada camundongo (figura 7). A partir destes resultados pode-se inferir que 8 semanas de dieta hiperlipídica não foi suficiente para promover hipertrofia cardíaca nestes camundongos.

Na análise do tecido adiposo por sistema de imageamento por raio-X, pode-se observar a diferença na quantidade de tecido adiposo nos coxins periepididimal e retroperitoneal conforme a figura 8:

Figura 8. Imageamento por raio-X com filtro para visualização de tecido adiposo – Imagens representativas

Visualização do tecido adiposo por raio-X com filtro (tecido adiposo demarcado em branco). Setas em preto apontam os coxins adiposos retroperitoneais. Setas em amarelo apontam os coxins adiposos periepididimais.

Na quantificação em porcentagem de tecido adiposo corpóreo ao final de 8 semanas de dieta (tabela 3), houve diferença significativa entre os grupos, sendo a porcentagem média de tecido adiposo no grupo dieta controle igual a $16,95 \pm 1,73\%$ e o no grupo dieta hiperlipídica igual a $28,33 \pm 5,88\%$ ($p \leq 0,001$). Esses dados comprovam ainda mais a eficiência do modelo de dieta hiperlipídica no ganho de tecido adiposo. Na análise de ganho de peso ao final de 8 semanas, o grupo dieta hiperlipídica obteve um ganho peso 2 vezes maior se comparado ao grupo dieta controle (tabela 3).

Tabela 3. Medidas de ganho de peso corpóreo e porcentagem de tecido adiposo em camundongos mantidos com as dietas depois de 8 semanas

PARÂMETROS	DIETA CONTROLE	DIETA HIPERLIPÍDICA
Tecido adiposo (%)	$16,95 \pm 1,73$ (n=5)	$28,33 \pm 5,88$ *** (n=10)
Ganho de peso (g)	$5,93 \pm 2,17$ (n=14)	$12,12 \pm 2,71^*$ (n=16)

* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$; n - número de animais usados em cada teste.

5.2 Avaliação da FC e PAS

Na avaliação da FC, o grupo dieta controle obteve valor médio de 609 ± 39 bpm enquanto o o grupo dieta hiperlipídica obteve um valor médio de 624 ± 50 bpm indicando um possível aumento na FC neste grupo, mas não significativa (tabela 4).

Tabela 4. Medidas de frequência cardíaca e pressão arterial sistólica em camundongos mantidos com as dietas depois de 8 semanas

PARÂMETROS	DIETA CONTROLE	DIETA HIPERLIPÍDICA
Frequência cardíaca	609 ± 39 (n=9)	624 ± 50 (n=16)
Pressão arterial sistólica	$117,5 \pm 10,9$ (n=9)	$103,8 \pm 5,2$ ** (n=16)

** $p \leq 0,01$; n - número de animais usados em cada teste.

Já na avaliação da PAS, houve diferença significativa entre grupos ($p \leq 0,01$), onde o grupo dieta controle apresentou uma média da PAS igual a $117,5 \pm 10,9$ mmHg, enquanto o grupo dieta hiperlipídica foi de $103,8 \pm 5,2$ mmHg, indicando uma queda dos níveis pressóricos neste grupo (tabela 4).

5.3 Avaliação do perfil lipídico e glicêmico sérico

Mensurando o perfil lipídico sérico, pode-se observar aumento dos níveis de colesterol total e LDL dos camundongos do grupo dieta hiperlipídica em relação ao grupo dieta controle (tabela 5). O valor sérico médio de colesterol no grupo controle foi igual e $141,5 \pm 23,2$ mg/dL enquanto no grupo dieta hiperlipídica foi de $182,9 \pm 32,0$ mg/dL ($p \leq 0,001$). Já o nível médio de LDL no grupo dieta controle foi de $86,37 \pm 17,9$ mg/dL e no grupo dieta hiperlipídica o valor médio foi de $112,9 \pm 24,3$ mg/dL ($p \leq 0,05$).

Tabela 5. Medidas séricas de HDL, LDL, VLDL colesterol, triglicérides e glicose em camundongos mantidos com as dietas depois de 8 semanas

PARÂMETROS	DIETA CONTROLE	DIETA HIPERLIPÍDICA
HDL (mg/dL)	$42,4 \pm 7,3$ (n=7)	$58,8 \pm 9,3$ (n=7)
LDL (mg/dL)	$86,4 \pm 17,9$ (n=7)	$112,9 \pm 24,3$ * (n=7)
VLDL (mg/dL)	$12,7 \pm 1,6$ (n=7)	$11,3 \pm 2,3$ (n=7)
Colesterol (mg/dL)	$141,5 \pm 23,2$ (n=7)	$182,9 \pm 32,0$ *** (n=7)
Triglicérides	$63,5 \pm 7,8$ (n=7)	$56,5 \pm 11,3$ (n=7)
Glicose (mg/dL)	$170,2 \pm 17,6$ (n=7)	$372,0 \pm 53,5$ *** (n=7)

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; n - número de animais usados em cada teste

O valor sérico médio de HDL no grupo dieta controle foi de $42,4 \pm 7,3$ mg/dL e no grupo dieta hiperlipídica de $58,8 \pm 9,3$ mg/dL. Nas estimativas das dosagens para VLDL, o grupo dieta controle apresentou um valor médio de $12,7 \pm 1,6$ mg/dL e $11,3 \pm 2,3$ mg/dL no grupo dieta hiperlipídica. As dosagens de triglicérides dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica foram $63,5 \pm 7,8$ mg/dL e $56,5 \pm 11,3$ mg/dL respectivamente. Não houve diferença significativa entre os grupos nesta dosagem.

Nas quantificações séricas de glicose, houve diferença significativa entre os grupos (tabela 5). O grupo dieta controle o valor médio foi de $170,2 \pm 17,6$ mg/dL e no grupo controle igual a $372,0 \pm 53,5$ mg/dL ($p \leq 0,001$), constatando o assim o aumento da glicemia neste grupo.

5.4 Análise morfométrica das artérias cardíacas e aortas

Na análise morfométrica de aorta e artérias cardíacas coradas com picrossirius pode-se observar apenas uma diferença sigfinicante da razãoentre túnica adventícia e túnica média em aortas de camundongos ($p \leq 0,001$). O grupo dieta controle esta razão foi igual a $1,16 \pm 0,04$, enquanto o grupo dieta controle foi igual a $1,57 \pm 0,09$ (figura 9b).

Figura 9. Análise morfométrica das artérias cardíacas e aortas

Razão entre áreas da tunicas média e da túnica íntima de aortas (Fig. 9a) e artérias cardíacas (Fig. 9c). Razão entre áreas da tunicas adventícia e da túnica média de aortas (Fig. 9b) e artérias cardíacas (Fig. 9d). (***) $p \leq 0,001$. Dieta Controle $n=5$; Dieta Hiperlipídica $n=5$.

5.5 Análise microscópica das fibras colágenas e elásticas por Weigert-VanGieson

Na análise microscópica das lâminas de aorta coradas com *Weigert-Van Gieson*, pode-se observar o aumento na deposição de colágeno (em vermelho escuro indicado por setas na figura 10b) na túnica adventícia no grupo dieta hiperlipídica, entretanto não houve diferenças na quantidade de rede elástica.

Figura 10. Fotomicrografias representativas de aortas dos camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica em coloração de Weigert-Van Gieson

10a

10b

Fotomicrografias representativas da aorta de camundongo dos grupos dieta controle (Figura 10a) e dieta hiperlipídica (Figura 10b). Coloração de Weigert-Van Gieson em microscopia de luz comum, aumento de 400X.

Na quantificação da área fibras colágenas em relação a área de fibras elásticas, o grupo dieta hiperlipídica obteve o valor médio de $1,272 \pm 0,264$. O grupo dieta controle obteve o valor médio de $0,770 \pm 0,128$ (figura 11), evidenciando assim o aumento de rigidez da parede vascular.

Figura 11. Razão entre a área das fibras colágenas e área das fibras elásticas delgadas nas aortas de camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica

Razão entre área das fibras colágenas e área das fibras elásticas em aorta dos camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica. Houve aumento significativo na deposição de fibras colágenas no grupo dieta hiperlipídica em comparação com o grupo dieta controle (* $p \leq 0,05$). Dieta Controle n=5; Dieta Hiperlipídica n=5.

5.4 Análise microscópica das fibras colágenas coradas com picrossirius

Na avaliação microscópica das lâminas de aorta coradas com picrossirius pôde-se observar o aumento na deposição de colágeno na túnica adventícia no grupo dieta hiperlipídica (figura 12c, fibras colágenas em vermelho, fotomicrografia em campo claro), além do aumento de fibras espessas vermelhas em relação as fibras delgadas verdes (figura 12d, microscopia de luz polarizada).

Figura 12. Fotomicrografias representativas de aortas dos camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica

12a

12b

12c

12d

Fotomicrografias representativas da aorta de camundongo dos grupos dieta controle (Figuras 12a e 12b) e dieta hiperlipídica (Figuras 12c e 12d). Coloração de picrossirius, aumento de 400X. *Figuras à esquerda:* microscopia de luz comum. *Figuras à direita:* microscopia de luz polarizada.

Na quantificação da área fibras colágenas em aortas, o grupo dieta hiperlipídica apresentou um aumento de 55 e 100 por cento da deposição de fibras delgadas e espessas respectivamente. A área média de fibras colágenas delgadas no grupo dieta hiperlipídica foi igual a $28209,83 \pm 6587,26 \mu\text{m}^2$, enquanto no grupo dieta controle a área média foi de $18155,40 \pm 2737,94 \mu\text{m}^2$ (figura 13). A área média de fibras colágenas espessas no grupo dieta hiperlipídica foi igual a $23519,56 \pm 6033,72 \mu\text{m}^2$, enquanto no grupo dieta controle a área média foi de $11630,690 \pm 4489,99 \mu\text{m}^2$ (figura 13).

Figura 13. Quantificação de fibras colágenas delgadas e espessas na túnica adventícia de aortas

Quantificação das fibras colágenas delgadas e espessas em aorta dos camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica. Houve aumento significativo na deposição de fibras espessase delgadas no grupo dieta hiperlipídica em comparação com o grupo dieta controle (** $p \leq 0,05$ em relação à área de fibra delgada no grupo dieta controle; ## $p \leq 0,05$ em relação à área de fibra espessa no grupo dieta controle). Dieta Controle $n=5$; Dieta Hiperlipídica $n=5$.

Na análise de ondulação das fibras colágenas na túnica adventícia de aorta, coradas com picrossirius em luz polarizada no aumento de 400X, pode-se observar o aumento significativo da entropia das fibras no grupo dieta hiperlipídica ($***p \leq 0,001$). A média da entropia nas fibras do grupo dieta controle foi de $18,4 \pm 7,7$, enquanto no grupo dieta hiperlipídica obteve um valor igual a $41,4 \pm 11,4$ (figura 14).

Figura 14. Quantificação da ondulação de fibras colágenas na túnica adventícia em aortas e distribuição angular das fibras colágenas

Quantificação da ondulação de fibras colágenas na túnica adventícia na aorta de camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica (fig.14a), onde ΔH representa a entropia das fibras ($***p < 0,001$). Histograma representativo da distribuição de orientação das fibras colágenas na túnica adventícia. A dieta hiperlipídica promoveu alterações das orientações angulares das fibras colágenas

5.5 Atividade enzimática da ECA

Os gráficos da figura 15 mostram a atividade da ECA em aorta e coração dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica. Na aorta, houve uma diferença significativa da atividade da ECA ($p \leq 0,05$), onde o grupo dieta controle obteve uma média de $759,9 \pm 101,2$ enquanto o grupo dieta hiperlipídica a média foi de $978,2 \pm 168,3$ unidades de fluorescência/ μg de proteína (figura 15a). Nos corações, não houve diferença significativa entre os grupos analisados. A atividade média no grupo dieta controle foi de $3238 \pm 758,2$ enquanto no grupo dieta hiperlipídica foi de $3354 \pm 574,0$ unidades de fluorescência/ μg de proteína (figura 15b).

Figura 15. Atividade enzimática da ECA em aortas e corações de camundongos dos grupos dieta controle e dieta hiperlipídica

15a

15b

Atividade enzimática da ECA em tecido aórtico (fig. 15a) e cardíaco (fig. 15b). Na aorta, o grupo mantido com a dieta hiperlipídica apresentou um aumento significatnte na atividade enzimática da ECA na aorta ($*p \leq 0,05$). Dieta Controle $n=4$, Dieta Hiperlipídica $n=6$.

5.6 Avaliação da expressão proteica da ECA e TGF- β

A expressão proteica de ECA em aortas de camundongos submetidos a dieta hiperlipídica foi maior comparado ao grupo submetido a dieta controle (figura 16a). Na quantificação por densitometria óptica das bandas, o grupo dieta hiperlipídica apresentou um aumento significativo na expressão proteica de ECA ($126,5 \pm 11,4\%$) comparado ao grupo dieta controle ($100,0 \pm 10,0\%$), constatado no gráfico da figura 16b.

Figura 16. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de ECA em aortas

16a

16b

Membranas representativas de expressão proteica de ECA e β -tubulina em aortas de camundongos dos grupos mantidos com dieta controle e dieta hiperlipídica (fig.16a). Quantificação da expressão proteica de ECA em relação a β -tubulina por densitometria óptica (fig.16b). Houve diferença significativa para grupo mantido com a sobrecarga lipídica (* $p \leq 0,05$). Dieta controle $n=8$; Dieta Hiperlipídica $n=10$.

Na avaliação da expressão proteica de TGF- β na aorta de camundongos, constatou-se o aumento da expressão proteica no grupo dieta hiperlipídica em relação ao grupo submetido a dieta controle (figura 17a). Em relação à quantificação por densitometria óptica das bandas, o grupo dieta hiperlipídica apresentou um aumento significativo na expressão proteica de TGF- β ($136,5 \pm 14,7\%$) comparado ao grupo dieta controle ($100,0 \pm 6,4\%$) constatado no gráfico da figura 17b.

Figura 17. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de TGF- β em aortas

17a

17b

Membranas representativas de expressão proteica de TGF- β e β -tubulina em aortas de camundongos dos grupos mantidos com dieta controle e dieta hiperlipídica (fig.17a). Quantificação da expressão proteica de TGF- β em relação a β -tubulina por densitometria óptica (fig. 17b). Houve diferença significativa para grupo mantido com a sobrecarga lipídica (** $p \leq 0,01$) Dieta controle $n=8$; Dieta Hiperlipídica $n=10$.

No tecido cardíaco a avaliação da expressão proteica de ECA não mostrou diferença notória na visualização das bandas (figura 18a). Também não ocorreram diferenças significantes na quantificação por densitometria óptica das bandas. O grupo dieta hiperlipídica apresentou uma média de $105,2 \pm 8,8\%$ comparado ao grupo controle com média igual a $100,0 \pm 7,1\%$, conforme o gráfico da Figura 18b.

Figura 18. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de ECA no coração

Membranas representativas de expressão proteica de ECA e β -tubulina em corações de camundongos dos grupos mantidos com dieta controle e dieta hiperlipídica (fig.18a). Quantificação da expressão proteica de ECA em relação a β -tubulina por densitometria óptica (fig.18b). Não houve diferença significativa para grupo mantido com a sobrecarga lipídica. Dieta controle n=8; Dieta Hiperlipídica n=10.

Comparando-se as expressões proteicas de TGF- β no coração, não houve diferença notória na visualização das bandas (figura 19a). Também não ocorreram diferenças significantes na quantificação por densitometria óptica das bandas. O grupo dieta hiperlipídica apresentou uma média de $106,8 \pm 12,9\%$ comparado ao grupo controle com média igual a $100,0 \pm 5,2\%$, conforme o gráfico da figura 19b.

Figura 19. Efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão proteica de TGF- β no coração

Membranas representativas de expressão proteica de TGF- β e β -tubulina em corações de camundongos dos grupos mantidos com dieta controle e dieta hiperlipídica (fig.19a). Quantificação da expressão proteica de TGF- β em relação a β -tubulina por densitometria óptica (fig. 19b). Não houve diferença significativa para grupo mantido com a sobrecarga lipídica. Dieta controle n=8; Dieta Hiperlipídica n=10.

5.7 Atividade enzimática da MPO

Em aortas houve uma diferença significativa na atividade da MPO, onde o grupo dieta hiperlipídica obteve um aumento de 90% da atividade enzimática em relação ao grupo dieta controle. O valor médio da atividade enzimática da MPO no grupo dieta controle foi igual a $0,0929 \pm 0,0342$ unidades de fluorescência / μg de proteína, enquanto o grupo dieta hiperlipídica a média foi de $0,1770 \pm 0,0500$ unidades de fluorescência / μg de proteína (figura 20a). Nos corações, houve diferença significativa na atividade da MPO, sendo que o grupo dieta hiperlipídica obteve um aumento de 490% da atividade enzimática em relação ao grupo dieta controle. A atividade média da MPO no grupo dieta controle foi de $0,0765 \pm 0,0388$ unidades de fluorescência / μg de proteína enquanto no grupo dieta hiperlipídica foi de $0,3754 \pm 0,1761$ unidades de fluorescência / μg de proteína (20b).

Figura 20. Atividade enzimática da MPO em aortas e corações

20a

20b

Atividade enzimática da MPO. O grupo dieta hiperlipídica apresentou um aumento significativo na atividade enzimática da MPO nos tecidos aórtico (20a) e cardíaco (20b). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. Dieta controle $n=5$, Dieta hiperlipídica $n=8$.

5.8 Análise descritiva da imunomarcacão para ECA e TGF- β em aortas

Na análise descritiva da imunomarcacão para ECA em aortas, pode-se observar intensa marcação na túnica íntima, na túnica média e no tecido adiposo multilocular perivascular na aorta de camundongos do grupo dieta hiperlipídica (figura 21b).

Figura 21. Fotomicrografias descritivas de imunomarcacão para ECA em aortas de camundongos submetidos às dietas

21a

21b

Fotomicrografias descritivas de imunomarcacão (coloração em castanho-marrom) para ECA na aorta de camundongo do grupo dieta controle (figura 21a) e na aorta de camundongos do grupo dieta hiperlipídica (figura 21b). A seta em preto à esquerda mostra o intensa marcação na túnica íntima na aorta; a seta em vermelho mostra uma área de intensa marcação na túnica média; a seta em verde à esquerda mostra o intensa marcação no tecido adiposo multilocular perivascular.

Na imunomarcacão para TGF- β em aortas, pode-se observar intensa marcação na túnica íntima, em porções da túnica adventciae no tecido adiposo multilocular perivascular na aorta de camundongos do grupo dieta hiperlipídica (figura 22b).

Figura 22. Fotomicrografias descritivas de imunomarcacão para TGF- β em aortas de camundongos submetidos às dietas

22a

22b

Fotomicrografias descritivas de imunomarcacão (coloração em castanho-marrom) para TGF- β na aorta de camundongo dos grupos dieta controle (fig. 22a) e na aorta de camundongos do grupo dieta hiperlipídica (fig. 22b). A seta em preto  direita mostra o intensa marcação na túnica íntima na aorta; seta em vermelho mostra intensa marcação na túnica adventícia; seta em verde à esquerda mostra o intensa marcação no tecido adiposo multilocular perivascular.

6 DISCUSSÃO

Através da medição do peso corpóreo observou-se o aumento do peso dos animais submetidos à dieta hiperlipídica, se comparado com a média do peso dos animais da dieta controle a partir da sétima semana. Na curva de pesagem corpórea observou-se uma diferença significativa entre os grupos, indicando que os animais em dieta hiperlipídica ganharam mais peso quando comparados aos da dieta controle. Cabe ressaltar a importância da utilização de uma ração hiperlipídica, com todos os valores de proteínas, vitaminas e demais nutrientes previamente corrigidos. A ração hiperlipídica desenvolvida e utilizada no estudo contém 30% a mais de energia comparada com a ração controle. Desta forma, os camundongos mantidos com a dieta hiperlipídica tendem a ingerir uma quantidade de ração menor, se comparados ao grupo controle. Sendo assim, o excesso de lipídios desta dieta provoca uma menor ingestão da ração, e deste modo haveria menor ingestão de proteínas, vitaminas e outros componentes importantes para o funcionamento adequado do metabolismo, gerando até um possível quadro de desnutrição proteica o qual comprometeria todo o estudo. Devido às correções feitas nos componentes da ração hiperlipídica, evita-se que os camundongos desenvolvam um quadro de desnutrição.

A partir das imagens dos animais obtidas por raio-X, observou-se maior acúmulo de tecido adiposo nos animais da dieta hiperlipídica, quando comparados aos da dieta controle. O acúmulo de gordura nos coxins epididimal e retroperitoneais é equiparado ao ganho de tecido adiposo visceral e central respectivamente em quadro de obesidade humana (ESTADELLA et al., 2004; GAIVA et al., 2001; SCHRAUWEN; WESTERTERP, 2000). Isso comprova a eficiência da dieta em provocar a sobrecarga lipídica nestes animais. O tipo de lipídio consumido na dieta pode alterar o acúmulo de tecido adiposo, onde existe uma alta correlação entre a porcentagem de gordura corporal e a porcentagem de gordura saturada e monoinsaturada ingeridos pela dieta (ROMIEU et al., 1988). O tecido adiposo além do armazenamento energético pode regular uma série de respostas hormonais, secretando uma série de proteínas produzidas e liberadas pelas células adiposas. Todavia, o excesso de tecido adiposo corpóreo promove ainda alterações na função sistólica, as quais podem ser um indicativo de alterações metabólicas, reações

inflamatórias nos cardiomiócitos, hipóxia, levando ao aumento risco para complicações cardiovasculares (GUSTAFSSON et al., 2005).

O aumento dos níveis séricos glicêmicos, aliado ao aumento dos níveis de colesterol, LDL-C, de tecido adiposo visceral e alteração na pressão arterial sistólica contribuem para o desenvolvimento de um quadro denominado síndrome metabólica (GOODMAN, 2008). A síndrome metabólica relaciona fatores como Diabetes Mellitus tipo 2 e dislipidemias, associados à resistência insulínica, e doenças cardiovasculares (PENALVA, 2008). Neste sentido, o aumento dos níveis glicêmicos e de colesterol total e LDL-C observados no grupo com dieta hiperlipídica vão ao encontro com esta visão da síndrome metabólica. Contudo, ao final do tratamento, observou-se diminuição da PAS nos animais que receberam dieta hiperlipídica, trazendo uma informação contrária ao que classicamente se descreve para a síndrome metabólica. Neste caso, postula-se que, se estes animais estão diabéticos, é possível que apresentem algum nível de neuropatia e, conseqüentemente, redução da atividade simpática sobre os vasos. Esta alteração do controle autonômico cardiovascular, com conseqüente queda de pressão arterial, está bem descrita em animais diabéticos (DALL'AGO et al., 1997; MAEDA et al., 1995). Embora a pressão arterial tenha se reduzido no grupo dieta hiperlipídica, a frequência cardíaca não se alterou entre os grupos. Levando em conta que a pressão arterial é dependente de débito cardíaco e resistência periférica, pode-se então inferir que a queda de resistência periférica deve ter sido preponderante na redução da pressão arterial. Novamente, esta redução da resistência periférica é compatível com o estado diabético.

Quando realizada a avaliação das aortas, verificou-se aumento da relação entre a túnica adventícia e a túnica média, sugerindo uma maior deposição de colágeno perivascular. A avaliação sob a luz polarizada indicou um aumento da relação entre fibras espessas e fibras delgadas de colágeno também nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Além disso, a avaliação da ondulação das fibras colágenas no vaso mostrou aumento de entropia, sugerindo não apenas um aumento na deposição de fibras de colágeno, mas também um aumento na desorganização destas, indicando um processo de enrijecimento arterial.

Esta avaliação poderia contradizer os resultados encontrados na pressão arterial, visto que se espera que um vaso enrijecido seja menos capaz de amortecer

as ondas de pressão sistólica, aumentando os níveis de pressão arterial. Portanto, esta observação seria contrária à redução de pressão arterial também verificada nestes animais. Contudo, não se pode esquecer que a aorta do camundongo, embora de tamanho reduzido, tem estrutura de artéria elástica, de condução. Sendo assim, as artérias responsáveis pelo controle efetivo da resistência periférica são as artérias musculares como as artérias cardíacas. Neste caso, quando as artérias cardíacas foram avaliadas, observou-se que a relação entre a túnica adventícia e a túnica média não mudou entre os grupos, indicando que estas artérias não sofreram qualquer alteração que pudesse se contrapor à queda de pressão arterial observada. Possivelmente, esta não alteração estrutural nas artérias cardíacas, associada à neuropatia diabética, pode ser um importante mecanismo na determinação desta queda de pressão arterial observada.

O aumento da atividade da MPO nos tecidos aórtico e cardíaco nos camundongos submetidos a dieta hiperlipídica é um importante indicativo de estresse oxidativo local, desencadeado pela acúmulo de lípidos. O estresse oxidativo ocasionado pela ação de espécies reativas de oxigênio contribui para alterações substanciais na rede vascular, sobretudo na reatividade do endotélio e a lesões provocadas pela dislipidemia (EISERICH et al., 2002).

Em vista da ativação endotelial, o aumento da expressão e atividade da ECA, motivado pela dieta rica em gordura animal é evidenciado nos dados obtidos neste trabalho. A partir das análises feitas pela técnica de imuno-histoquímica, na aorta de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica, observa-se intensa marcação na túnica íntima, destacando assim o papel de células endoteliais na expressão proteica desta enzima. Também foi possível observar marcação positiva para ECA bem evidente no tecido adiposo multilocular perivascular, de modo a evidenciar que componentes do SRA estão presentes em situações de atividade tecidual local. Estes dados apontam que o SRA local pode ser uma via capaz de alimentar processos pré-inflamatórios, uma vez que a produção de Ang II pode atuar não apenas no controle de constrição do vaso, mas também em respostas inflamatórias. Tal resposta inflamatória seria capaz de provocar a proliferação celular e ativação de células do sistema imune como monócitos. A Ang II é capaz ainda de iniciar respostas de estresse oxidativo, levando à produção de espécies reativas de

oxigênio (EROs), as quais acabam consumindo o NO vascular, crucial para o relaxamento dos vasos (USHIO-FUKAI et al., 1999).

O enrijecimento arterial envolve mecanismos de remodelamento da MEC promovidos pelo aumento da deposição de colágeno, através de mecanismos iniciados pela ativação de células endoteliais e fibroblastos. Macrófagos, neutrófilos, células T e adipócitos podem induzir o enrijecimento da parede vascular por estímulos parácrinos. O estresse oxidativo também pode promover o enrijecimento aórtico, capaz de induzir o remodelamento da parede vascular.

O SRA e EROs podem iniciar remodelamento da parede vascular através do aumento da expressão de MMPs (ZIEMAN; MELENOVSKY; KASS, 2005). Polimorfismos genéticos do gene da ECA estão relacionados com o enrijecimento arterial, contribuindo para o aumento da produção de Ang II local de modo a intensificar processos inflamatórios vasculares (DIMA et al., 2008). O SRA pode ainda atuar localmente sobre a vasculatura de forma independente do SRA sistêmico, sendo capaz de produzir renina, Ang I, Ang II e ECA (LEOPOLD, 2013). O tecido adiposo perivascular também é capaz de produzir componentes do SRA como ECA e Ang II, contribuindo de forma autócrina e parácrina para o desenvolvimento de respostas inflamatórias (LEOPOLD, 2013).

Embora o modelo utilizado neste estudo não seja o que leva à formação de aterosclerose, cabe ressaltar que alterações na estrutura da parede vascular arterial podem fornecer evidências para identificação de fenômenos pré-inflamatórios. Tais fenômenos podem comprometer a estrutura e a função vascular. Com isso, o limiar que o vaso pode suportar antes da formação de um processo aterosclerótico é de extrema importância para que no futuro se possam desenvolver estratégias contra o condicionamento arterial pró-fibrótico. O aumento da atividade enzimática da ECA em aorta sugere um aumento da produção de Ang II local frente ao estímulo lipídico e estresse oxidativo gerado. A sobrecarga lipídica poderia promover alterações substanciais no balanço de atuação do SRA.

A Ang II também tem sido identificada como um fator de aceleração de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, através de seu efeito sobre a síntese de colesterol por macrófagos (KEIDAR et al., 1999). A Ang II, além de ser um peptídeo que exerce um papel central na homeostase cardiovascular, regulando a vasoconstrição e a pressão arterial (TAUBMAN, 2003), vem sendo considerada

uma citocina multifuncional. Desta forma, esta pode atuar com propriedades não-hemodinâmicas, entre as quais a de fator de crescimento, de citocina pró-fibrinogênica e pró-inflamatória (WOLF; BUTZMANN; WENZEL, 2003), e modulador da resposta imunológica, levando à quimiotaxia, à proliferação e à diferenciação de monócitos em macrófagos (RUIZ-ORTEGA et al., 2007).

Embora grande parte destes dados provenha de estudos em rim, pode-se postular os processos pelos quais a Ang II funcionaria como citocina pró-inflamatória no vaso, micro-ambiente normalmente afetado pelo SRA (IRIGOYEN, 2005). Ressalta-se, ainda, que pacientes hipertensos apresentam aumento de moléculas de adesão no soro e em células inflamatórias (RUIZ-ORTEGA et al., 2007), fato que deve estar diretamente associado às ações inflamatórias da Ang II (IRIGOYEN, 2005).

O TGF- β assume um papel importante nos processos de remodelamento vascular, uma vez que este possui um papel importante em repostas pró-fibróticas (RUIZ-ORTEGA et al., 2007). A partir dos ensaios de imuno-histoquímica realizados, pode-se a intensa marcação do TGF- β em aortas de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Através desta técnica, pode-se observar que o TGF- β pode ser encontrado em células endoteliais nas túnicas íntima e média, mas também em grandes porções da túnica adventícia, bem como no tecido adiposo multilocular perivascular. O aumento de TGF- β local pode ocorrer de forma rápida em resposta à ativação SRA via Ang II (SOUZA-OLIVEIRA, 2010).

O aumento da deposição de colágeno na túnica adventícia da parede vascular aórtica dos camundongos submetidos a dieta hiperlipídica é evidenciado nos ensaios histológicos realizados neste estudo. Este processo pode ser relacionado com a ativação do SRA local, indicado pelo aumento da expressão proteica e da atividade enzimática da ECA. Por sua vez, esta ativação do SRA via ECA, pode ser uma evidência do aumento da ação de Ang II local, a qual pode contribuir com o processo de remodelamento vascular.

Além disso, a Ang II possui um papel importante no remodelamento da MEC, através de sua ação via AT1r e AT2r, aumentando a síntese e a deposição de colágeno, reduzindo a sua degradação (FORD; LI; PICKERING, 1999). O alto grau de ondulação das fibras colágenas na túnica adventícia da aorta promovido pela

dieta hiperlipídica, representa outro ponto de modificação estrutural que pode estar sendo mediado direta ou indiretamente pelo SRA local.

Assim, os dados obtidos contribuem para mostrar que a dieta hiperlipídica no modelo murino é capaz de induzir o espessamento da parede vascular da aorta através do aumento da deposição e da desorganização das fibras espessas de colágeno. As respostas de remodelamento da MEC dependem de três fatores cruciais, como: mudanças hemodinâmicas, fatores humorais desencadeando síntese, liberação e ativação de substâncias que podem influenciar no crescimento, morte ou migração celular (liberação de TGF- β) e alterações estruturais na parede vascular (GIMBRONE; GARCIA-CARDENA, 2013). Desta forma, as evidências mostradas nos resultados obtidos até o momento dão suporte para a ideia de que o remodelamento vascular em resposta à dieta hiperlipídica deve ser dependente de mecanismos oxidativos e pró-inflamatórios, envolvendo o sistema renina-angiotensina.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a dieta hiperlipídica no modelo murino é capaz de promover alterações fisiológicas e metabólicas, possivelmente por:

- 1) Aumentos dos níveis séricos de LDL, colesterol e hiperglicemia, associados à queda de pressão, possivelmente induzida pela neuropatia diabética, sem alteração morfométrica das artérias cardíacas;
- 2) Enrijecimento da parede vascular aórtica, devido ao espessamento da túnica adventícia;
- 3) Aumento da resposta inflamatória no tecido cardíaco e aórtico, indicado pelo aumento da atividade da MPO;
- 4) Aumento da expressão proteica de TGF- β na aorta, associado ao enrijecimento arterial indicado pelo aumento da deposição de fibras colágenas, assim como pelo aumento da desorganização destas fibras;
- 5) Aumento da expressão proteica e da atividade enzimática da ECA na aorta, associados ao processo de enrijecimento arterial.

REFERÊNCIAS*

- ANNES, J. P.; MUNGER, J. S.; RIFKIN, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. **J. Cell Sci**, v. 116, pt 2, p. 217-224, 2003.
- ASSMANN, G.; NOFER, J. R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. **Annu. Rev. Med.**, v. 54, p. 321-341, 2003.
- AYRES, M. M. **Fisiologia**. In: GEN, G. K. (Ed.). 4. ed.. Rio de Janeiro, 2012. cap. 27, p. 381-385.
- BERNSTEIN, K. E. et al. A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. **Pharmacol. Rev.**, v. 65, n. 1, p. 1-46, Jan 2013.
- BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J. Pathol.**, v. 200, n. 4, p. 423-428, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências**. Brasília, DF, 2011
- BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, 1986.
- BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.
- CAMPBELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. **J. Clin. Invest.**, v. 79, n. 1, p. 1-6, 1987.
- CAMPBELL, D. J. et al. Impact of type 2 diabetes and the metabolic syndrome on myocardial structure and microvasculature of men with coronary artery disease. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 10, p. 80, 2011.
- CARVALHO, M. H. et al. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **J. Hypertens.**, v. 5, n. 3, p. 377-382, 1987.
- CARVALHO-FILHO, M. A. D. et al. Insulin and angiotensin II signaling pathways cross-talk: implications with the association between diabetes mellitus, arterial hypertension and cardiovascular disease. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 2, p. 195-203, 2007.
- CHEN, J. Y. et al. Increased aortic stiffness and attenuated lysyl oxidase activity in obesity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 33, n. 4, p. 839-846, 2013.
- OPEN STAX. Structure and Function of Blood Vessels. 2013.
- DALL'AGO, P. et al. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz. J Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 1, p. 119-124, 1997.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DARLEY-USMAR, V.; HALLIWELL, B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. **Pharm. Res.**, v. 13, n. 5, p. 649-662, 1996.

DAVID SCHMITT et al. Leukocytes Utilize Myeloperoxidase-Generated Nitrating Intermediates as Physiological Catalysts for the Generation of Biologically Active Oxidized Lipids and Sterols in Serum, **Biochemistry**, v. 51, p. 16904–16915, 1999

DIMA, I. et al. Association of arterial stiffness with the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in healthy individuals. **Am. J. Hypertens.**, v. 21, n. 12, p. 1354-1358, 2008.

DZAU, V. J.; KRIEGER, J. E.; HUTCHINSON, H. G. Molecular mechanisms of hypertension. **Scientific American Inc.**, p. 225-442, 1995

DZAU, V. J.; LOPEZ-ILASACA, M. Searching for transcriptional regulators of Ang II-induced vascular pathology. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 9, p. 2319-2322, 2005.

EISERICH, J. P. et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO Oxidase. **Science**, v. 296, p. 2391-2394, 2002.

ERDOS, E. G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. **Hypertension**, v. 16, n. 4, p. 363-370, 1990.

ESTADELLA, D. et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004.

FENYO, I. M.; GAFENCU, A. V. The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. **Immunobiology**, 2013. In press.

FORD, C. M.; LI, S.; PICKERING, J. G. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in human vascular smooth muscle cells. Involvement of the AT(1) receptor, transforming growth factor-beta, and tyrosine phosphorylation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 19, n. 8, p. 1843-1851, 1999.

GAIVA, M. H. et al. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **Br. J. Nutr.**, v. 86, n. 3, p. 371-377, 2001.

GERRITY, R. G.; CLIFF, W. J. The aortic tunica intima in young and aging rats. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 16, n. 3, p. 382-402, 1972.

GIBBONS, G. H.; PRATT, R. E.; DZAU, V. J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. **J. Clin. Invest.**, v. 90, n. 2, p. 456-461, 1992.

GIMBRONE, M. A., JR.; GARCIA-CARDENA, G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. **Cardiovasc. Pathol.**, v. 22, n. 1, p. 9-15, 2013.

GIMBRONE, M. A., JR.; NAGEL, T.; TOPPER, J. N. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 8, p. 1809-1813, 1997.

GOODMAN, E. Metabolic syndrome and the mismeasure of risk. **J. Adolesc. Health. United States**, v. 42, p. 538-540, 2008.

GORDON, D. J. et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. **Circulation**, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1989.

GOSS, S. P. et al. Reactions of *NO, *NO₂ and peroxynitrite in membranes: physiological implications. **Free Radic. Res.**, v. 31, n. 6, p. 597-606, 1999.

GUSTAFSSON, F. et al. Effect of obesity and being overweight on long-term mortality in congestive heart failure: influence of left ventricular systolic function. **Eur. Heart J.**, v. 26, p. 58-64, 2005.

HOOPEER, N. M. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. **Int. J. Biochem.**, v. 23, n. 7-8, p. 641-647, 1991.

IGIC, R.; BEHNIA, R. Properties and distribution of angiotensin I converting enzyme. **Curr. Pharm. Des.**, v. 9, n. 9, p. 697-706, 2003.

IRIGOYEN, M. C. **Tratado de Cardiologia SOCESP**. São Paulo: Manole, 2005.

JACOB, P. S. et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. **Cell Biochem. Funct.**, v. 31, n. 3, p. 244-253, 2013.

KEIDAR, S. et al. Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. **Atherosclerosis**, v. 146, n. 2, p. 249-257, 1999.

KHALIL, N. et al. Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 15, n. 2, p. 252-259, 1996.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. In: LTDA, E. E. (Ed.). 3. ed. 2012. cap.12, p. 367-381.

KLOP, B.; ELTE, J.; CABEZAS, M. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1218-1240, 2013.

KWITEROVICH, P. O., JR. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. **Am. J. Cardiol**, v. 86, n. 12a, p. 5-10, 2000.

LEOPOLD, J. A. Cellular and molecular mechanisms of arterial stiffness associated with obesity. **Hypertension**, 2013. In press.

MAEDA, C. Y. et al. Streptozotocin diabetes modifies arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, n. 4, p. 497-501, 1995.

METTOUCHI, A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. **Cell Adh. Migr.**, v. 6, p. 528-534, 2012.

MULVANY, M. J. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on vascular remodelling of resistance vessels in hypertensive patients. **J. Hypertens. Suppl.**, v. 14, n. 6, p. 21-24, 1996.

NAFTILAN, A. J. Role of the tissue renin-angiotensin system in vascular remodeling and smooth muscle cell growth. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 3, n. 2, p. 218-227, 1994.

NAKAMURA, S. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo. **Kidney Int.**, v. 58, n. 1, p. 251-259, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS. **World health statistics 2013**. 2013

PALATINI, P. et al. Arterial stiffness, central hemodynamics, and cardiovascular risk in hypertension. **Vasc.. Health Risk Manag.**, v. 7, p. 725-739, 2011.

PEEBLES, R. Adolescent obesity: etiology, office evaluation, and treatment. **Adolesc. Med. State Art. Ver.**, v. 19, n. 3, p. 380-405, vii, 2008.

PENALVA, D. Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento. **Rev. Med.**, v. 87, p. 245-250, 2008.

PIRILLO, A.; NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. High-density lipoprotein subfractions--what the clinicians need to know. **Cardiology**, v. 124, n. 2, p. 116-125, 2013.

PLENZ, G. A. et al. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 1, p. 1-11, 2003.

PROVENZANO, P. P. et al. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, v. 66, n. 11, p. 11, 2008.

PRYOR, W. et al. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. **Science**, v. 220, p. 425-427, 1983.

PUTNAM, K. et al. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 302, p. 1219-1230, 2012.

QIN, C. et al. Elevated plasma membrane cholesterol content alters macrophage signaling and function. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 26, n. 2, p. 372-378, Feb 2006.

RIGOTTI, A. et al. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 23, p. 12610-12615, 1997.

ROMIEU, I. et al. Energy intake and other determinants of relative weight. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 47, n. 3, p. 406-412, 1988.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, n. 8, p. 488-500, 1986.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. **Cardiovasc. Res.**, v. 74, n. 2, p. 196-206, 2007.

SCHRAUWEN, P.; WESTERTERP, K. R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **Br. J. Nutr.**, v. 84, n. 4, p. 417-427, 2000.

SCHRIEFL, A. J. et al. Remodeling of intramural thrombus and collagen in an Ang-II infusion ApoE^{-/-} model of dissecting aortic aneurysms. **Thromb. Res.**, v. 130, n. 3, p. 139-146, 2012.

SCHWARTZ, M. W.; BASKIN, D. G. Leptin and the brain: then and now. **J. Clin. Invest.**, v. 123, n. 6, p. 2344-2345, 2013.

SKRBIC, R.; IGIC, R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1945-1950, 2009.

SOUZA-OLIVEIRA, T. C. **Ação da angiotensina II associada ao bloqueio dos receptores AT₁ e AT₂ no processo inflamatório das lesões vasculares**. São Paulo, 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

STENMARK, K. R. et al. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 75, p. 23-47, 2013.

TADDEI, S. et al. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. **Drugs**, v. 62, n. 2, p. 265-284, 2002.

TAUBMAN, M. B. Angiotensin II: a vasoactive hormone with ever-increasing biological roles. **Circ. Res.**, v. 92, n. 1, p. 9-11, 2003.

TENNANT, M.; MCGEACHIE, J. K. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v. 60, n. 10, p. 747-753, 1990.

THATCHER, S. et al. The adipose renin-angiotensin system: role in cardiovascular disease. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 302, n. 2, p. 111-117, 2009.

OGDEN C.L.; YANOVSKI S.Z.; CARROLL M.D.; Flegal K.M. The Epidemiology of Obesity. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2087-2102, 2007.

TSAMIS, A.; KRAWIEC, J. T.; VORP, D. A. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. **J. R. Soc. Interface**, v. 10, n. 83, p. 201-210, 2013.

ULLEVIG, S.; KIM, H. S.; ASMIS, R. S-glutathionylation in monocyte and macrophage (dys)function. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 8, p. 15212-15232, 2013.

USHIO-FUKAI, M. et al. Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 32, p. 22699-22704, 1999.

VAN LINTHOUT, S. et al. Vascular-protective effects of high-density lipoprotein include the downregulation of the angiotensin II type 1 receptor. **Hypertension**, v. 53, n. 4, p. 682-687, 2009.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. **Physiol. Rev.**, v. 89, n. 3, p. 957-989, 2009.

WANDERLEY, E. N. et al. Obesity: a plural perspective. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.

WOLF, G.; BUTZMANN, U.; WENZEL, U. O. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. **Nephron. Physiol.**, v. 93, n. 1, p. 3-13, 2003.

ZHANG, R. et al. Myeloperoxidase Functions as a Major Enzymatic Catalyst for Initiation of Lipid Peroxidation at Sites of Inflammation. **J. Bio. Chem.**, v.277, p. 46116-46122, 2002.

ZIEMAN, S. J.; MELENOVSKY, V.; KASS, D. A. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 5, p. 932-943, 2005.