CAROLINA MIDORI HASHIMOTO

TRATAMENTO CRÔNICO COM LOSARTANA CORRIGE A DISFUNÇÃO DO TECIDO ADIPOSO PERIVASCULAR EM CAMUNDONGOS OBESOS

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

CAROLINA MIDORI HASHIMOTO

TRATAMENTO CRÔNICO COM LOSARTANA CORRIGE A DISFUNÇÃO DO TECIDO ADIPOSO PERIVASCULAR EM CAMUNDONGOS OBESOS

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dra^a Eliana Hiromi Akamine

Versão corrigida.

A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

© reprodução parcial

Hashimoto, Carolina Midori.

Tratamento crônico com losartana corrige a disfunção do tecido adiposo perivascular em camundongos obesos / Carolina Midori Hashimoto. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Eliana Hiromi Akamine.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Biologia vascular.

Versão do título para o inglês: Chronic treatment with losartan corrects the dysfunction of perivascular adipose tissue in obese mice.

 Obesidade 2. Sistema renina-angiotensina 3. Tecido adiposo perivascular 4. Reatividade vascular 5. I. Akamine, Eliana Hiromi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciêncais Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB099/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Carolina Midori Hashimoto.
Título da Dissertaçã	 Tratamento crônico com losartana corrige a disfunção do tecido adiposo perivascular em camundongos obesos.
Orientador(a):	Eliana Hiromi Akamine.
em sessão púb	gadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, lica realizada a
Examinador(a):	Assinatura:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura:



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 195 nas fls. 116 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Eliana Hiromi Akamine, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Obesidade senescência celular e disfunção endotelial: efeito da desidroepiandrosterona" do qual participam o(s) aluno(s) Carolina Midori Hashimoto, Paula Kimie Honda, Leticia Yumi Hayashi e as pesquisadoras Zuleica Bruno Fortes, Maria Helena Catelli de Carvalho, Graziela Scalianti Ceravolo, 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 08.12.2011, com validade de 4 anos.

São Paulo, 27 de janeiro de 2012.

Prof.Dr.Wothan Tavares de Lima Coordenador

CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER

Secretário CEUA – ICB/USP

Aos meus preciosos pais, Nelson e Solange, por sempre estarem presentes e me apoiarem todos os dias com o maior amor do mundo. Ao meu amado noivo, Renan, por compartilhar comigo cada detalhe dessa longa jornada e sempre me ajudar a seguir em frente. Aos meus queridos avós, Dona Ida e Sr. "Lu", que mesmo de longe me davam forças, pois demonstraram imenso orgulho durante toda a minha caminhada. Ao meu estimado primo, Paulo, por me ensinar que nunca devemos desistir de lutar, não importa as circunstâncias.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu a vida e junto com ela oportunidades únicas como essa que pude viver aqui. E o grande detalhe: nunca deixou de me amparar. Agradeço pela força concedida ao longo desses anos, pela fé que graças a Ele nunca me faltou... Obrigada por guiar os meus passos e encher sempre a minha vida de luz.

Aos meus pais, por toda a paciência, carinho, compreensão e amor que eu recebi durante a minha jornada. Obrigada por serem pessoas tão maravilhosas. Vocês me inspiram cada dia mais!

Ao Renan, agradeço por ser tão especial. Ter você ao meu lado me fez ser uma pessoa melhor e a encarar a vida de outra forma. Obrigada por sempre me ouvir, me aconselhar, me dar forças... Não sei como seria sem você! Obrigada por tudo!

A todos meus amados familiares e amigos mais próximos: Agradeço por compreenderem minha ausência diversas vezes e me fazerem tão feliz nos momentos de folga. Meu amor por vocês é muito grande.

À Prof^a Dra. Eliana, minha orientadora, que muitas vezes usou todo o seu precioso tempo para me ouvir e ajudar, tanto na vida acadêmica, como na vida pessoal. Minha eterna admiração e gratidão por ter sido tão presente em todos os sentidos. Aprendi muito todos os dias e agradeço com todo o meu coração. É muito prazeroso ser sua aluna!

Às professoras Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho e Dra. Zuleica Bruno Fortes por todo o suporte nesses anos. Obrigada por acreditarem em mim!

À Prof^a Dra. Maria Luiza Barreto Chaves, Prof^o William Festuccia e Caroline Antunes Lino por toda a atenção e auxílio.

Às parceiras que o mestrado me deu e que vou levar para a vida, e que junto comigo, formaram o trio de trabalho mais unido que já conheci: Aline e Renée. Sou grata por toda a ajuda que recebi de vocês, por todos os ensinamentos, palavras de apoio e momentos de descontração. Vocês moram no meu coração!

Às amigas queridas de Usp: Andrea, Bia, Cida, Cinthya, Maristella, Marta, Milene, Rosa, Sandra, Sônia, Vanessa Franco e Vanessa Oliveira, por tornarem o ambiente de trabalho agradável e feliz. Vocês contribuíram muito para que os dias fossem mais tranquilos. Todas estarão sempre no meu coração, muito obrigada!

Aos meninos Antônio, Lucas, Manoel e Stephen, pela ótima convivência no laboratório.

À minha querida amiga Simone, que nunca negou esforços para me auxiliar. Sempre disse que você é minha mentora e tenha certeza que levarei isso para sempre comigo. Obrigada por ser tão incrível!

Ao meu amigo Tiago, que esteve presente em todos os momentos, tanto nas questões acadêmicas como na caminhada da vida. Foi um prazer trabalhar com você!

À todos os estagiários que passaram pelo nosso laboratório, especialmente Hikaru, Marina, Paula e Vanessa, que me deram a oportunidade de acompanhá-los de perto e assim aprender bastante como é estar "do outro lado".

Às secretárias: Camila, Miriam, Mônica e Selma por todo o auxílio e amizade.

Às colegas da biblioteca, especialmente Valéria e Tereza, pela grande ajuda e atenção nessa reta final.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.



RESUMO

Hashimoto CM. Tratamento crônico com losartana corrige a disfunção do tecido adiposo perivascular em camundongos obesos. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2016.

O tecido adiposo perivascular (PVAT) produz fatores vasoativos. O PVAT da aorta torácica (AT) possui ação anticontrátil em condições fisiológicas. No entanto, o PVAT é marrom na AT e branco nas artérias mesentéricas de resistência (AM) e os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) são expressos de maneira diferente nos dois tipos de PVAT, sugerindo que a influência do PVAT no tônus vascular depende do leito vascular. Além disso, ocorre expansão do PVAT na obesidade, que pode modificar sua ação sobre o tônus vascular. No presente estudo, avaliamos o efeito da obesidade sobre a modulação da resposta contrátil pelo PVAT da AT e de AM e a participação efeito. Para tanto, avaliamos do SRAA nesse concentração-resposta para noradrenalina em anéis de AT e de AM, sem e com o PVAT intacto, de camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta padrão (CT) ou hiperlipídica (OB) por 16 semanas. A participação do SRAA foi avaliada pelo tratamento dos camundongos com antagonista do receptor AT1 losartana (LOS) por 4 semanas. A presenca do PVAT reduziu a contração induzida pela noradrenalina em anéis de AT e AM no grupo CT, mostrando uma ação anticontrátil do PVAT marrom e branco. O efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco foi perdido no grupo OB, diferente do PVAT marrom, que teve o seu efeito anticontrátil preservado. O tratamento crônico com LOS resgatou o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco no grupo OB, que foi abolido na presença do antagonista do receptor AT2 PD 123,319. Inibidor da óxido sintase L-NAME não modificou a ação do PVAT branco no grupo CT e OB, porém impediu a ação anticontrátil do PVAT branco no grupo OB tratado com LOS. O conteúdo proteico dos receptores AT1 e AT2 não foi diferente entre AM dos grupos CT e OB. O conteúdo proteico da enzima eNOS foi aumentado nas AM dos grupos OB, o qual não foi modificado pelo tratamento com LOS. Por outro lado, o conteúdo proteico de eNOS foi diminuído no PVAT branco do grupo OB. O tratamento com LOS aumentou o conteúdo proteico de eNOS no PVAT branco dos dois grupos, porém esse conteúdo ainda foi menor no grupo OB. Diante desses dados, podemos concluir que a obesidade induz disfunção do PVAT branco e o SRAA pode estar envolvido. O tratamento crônico com LOS é capaz de corrigir a função do PVAT branco, por meio de mecanismo dependente de receptor AT2 e NO.

Palavras-chave: Tecido adiposo perivascular. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Obesidade. Reatividade vascular.

ABSTRACT

Hashimoto CM. Chronic treatment with losartan corrects the dysfunction of perivascular adipose tissue in obese mice. [Masters thesis (Pharmacology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2016.

The perivascular adipose tissue (PVAT) releases vasoactive factors. The PVAT of thoracic aorta (TA) has an anticontractile action in physiological conditions. However, PVAT is brown in TA and white in resistance mesenteric arteries (MA) and the components of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) are expressed differently in TA and MA PVAT, suggesting that the influence of PVAT in vascular tone depends on the vascular bed. Furthermore, expansion of PVAT occurs in obesity, which can modify its action on vascular tone. In the present study, we evaluated the effect of obesity on the modulation of vascular contraction by PVAT of TA and MA and the participation of RAAS in the process. We performed concentration-response curves to noradrenaline in TA and MA rings, without and with intact PVAT, of C57BI/6 mice fed with standard (CT) or high-fat (OB) diet during 16 weeks. The participation of RAAS was evaluated by treating mice with the AT1 receptor antagonist losartan (LOS) during 4 weeks. The presence of PVAT reduced the contraction induced by noradrenaline in both TA and MA, which showed an anticontractile action of both brown and white PVAT. The anticontractile effect induced by white PVAT. but not by brown PVAT, was abolished in the OB group. Chronic treatment with LOS recovered the anticontractile action of white PVAT in OB group, which was abolished in the presence of AT2 receptor antagonist PD 123,319. Nitric oxide synthase inhibitor L-NAME did not change the action of PVAT in both CT and OB group, but blocked the anticontractile action of white PVAT in OB group treated with LOS. The protein abundance of AT1 and AT2 receptors was not different between CT and OB groups. The protein abundance of eNOS was increased in MA of OB group, which was not modified by treatment with LOS. On the other hand, the protein abundance of eNOS was reduced in white PVAT of OB group. The treatment with LOS increased the protein abundance of eNOS in both CT and OB groups, but the abundance was still lower in OB group. In conclusion, obesity induced white PVAT dysfunction, in which RAAS may be involved. The chronic treatment with LOS recovered the white PVAT function by mechanisms that depend on the AT2 receptor and nitric oxide.

Keywords: Perivascular adipose tissue. Renin-angiotensin-aldosterone system. Obesity. Vascular reactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução ponderal e consumo semanal médio de ração e calorias
de camundongos alimentados com ração padrão (controle, CT) e ração
hiperlipídica (obeso, OB) por 16 semanas, e que receberam losartana (LOS) ou
não durante as 4 últimas semanas
Figura 2 – Massa corpórea final, índice de Lee {[massa corpórea $^{1/3}$
(g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100} e massa dos depósitos de gordura
retroperitoneal e periepididimal e do músculo gastrocnêmio de camundongos
alimentados com ração padrão (CT) e ração hiperlipídica (OB) por 16 semanas,
tratados ou não com losartana
Figura 3 - Glicemia de camundongos alimentados com ração padrão (CT) e
ração hiperlipídica (OB) por 16 semanas, tratados ou não com losartana 41
Figura 4 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de
artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos
controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não com losartana (LOS) 43
Figura 5 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de
artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos
controles (CT) e obesos (OB), incubados com losartana
Figura 6 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de
artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos
controles (CT) e obesos (OB), incubados com apocinina
Figura 7 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de
artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos
controles (CT) e obesos (OB) tratados com losartana (LOS), incubados com PD
123,319
Figura 8 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de
artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos
controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não com losartana (LOS), incubados
com L-NAME (LN)
Figura 9 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de
aorta torácica com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles
(CT) e obesos (OB)

Figura 10 - Curvas concentração-resposta para serotonina em anéis de aorta
torácica com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e
obesos (OB)
Figura 11 - Conteúdo proteico do receptor AT1 em artérias mesentéricas de
camundongos controles (CT) e obesos (OB). Imagens representativas do
imunoblotting para AT1 e da respectiva membrana corada com Ponceau.
Densidade óptica das bandas de AT1 normalizada pela densidade óptica das
bandas coradas com Ponceau das respectivas amostras 52
Figura 12 - Conteúdo proteico do receptor AT2 em artérias mesentéricas de
camundongos controles (CT) e obesos (OB). Imagens representativas do
imunoblotting para AT2 e GAPDH. Densidade óptica das bandas de AT2
normalizada pela densidade óptica das bandas de GAPDH das respectivas
amostras
Figura 13 - Conteúdo proteico da enzima eNOS em artérias mesentéricas de
camundongos controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não com losartana.
lmagens representativas do imunoblotting para eNOS e da respectiva
membrana corada com Ponceau. Densidade óptica das bandas de eNOS
normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau das
respectivas amostras
Figura 14 - Conteúdo proteico da enzima eNOS no PVAT de artérias
mesentéricas de camundongos controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não
com losartana. Imagens representativas do imunoblotting para eNOS e da
respectiva membrana corada com Ponceau. Densidade óptica das bandas de
eNOS normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau
das respectivas amostras

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos anéis de artérias mesentéricas
Tabela 2 - Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de
artérias mesentéricas à noradrenalina
Tabela 3 - Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de
artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do antagonista do recepto
AT1 losartana
Tabela 4 - Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de
artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do inibidor da NADPH
oxidase apocinina
Tabela 5 - Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de
artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do antagonista do recepto
AT2 PD 123,319
Tabela 6 - Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de
artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do inibidor da óxido nítrico
sintase
Tabela 7 – Características dos anéis de aorta torácica
Tabela 8 - Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de
aorta torácica à noradrenalina
Tabela 9 - Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de
aorta torácica à serotonina

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO Associação Brasileira para o Estudo da

Obesidade e da Síndrome Metabólica

AM artéria mesentérica

Ang I Angiotensina I Angiotensina II

ANOVA análise de variância

AT aorta torácica
AT1 receptor AT1
AT2 receptor AT2

©C graus Celsius

C57BL/6 camundongo da linhagem C57BL/6
CBA camundongo da linhagem CBA

CEUA Comissão Experimental do Uso de Animais

cm centímetro

CT grupo controle

CT+LOS grupo controle tratado com losartana

DTT ditiotreitol

ECA Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
eNOS Óxido Nítrico Sintase endotelial

epm erro padrão da média

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

FRDP Fator de Relaxamento Derivado do PVAT

g grama

H₂O₂ peróxido de hidrogênio IC circunferência interna

ICB Instituto de Ciências Biomédicas

 \mathbb{L} -1β Interleucina-1β IL-6

IMC Índice de Massa Corporal

i.p. via intraperitoneal

kcal/g quilocaloria/grama

kg quilograma kPa quilopascal

Lep leptina

L-NAME L-NG-Nitroarginine methyl ester

LN L-NAME
LOS losartana
M molar

µL microlitro

µM micromolar

µm micrômetro

mΑ

MAHMA NONOato Metilamina hexametileno metilamina NONOato

miliampere

MCP-1 Proteína Quimiotáxica de Monócito-1

mg/dL miligrama/decilitro mg/g miligrama/grama

ng/g miligrama/grama

mg/Kg miligrama/quilograma

mg/L miligrama/litro

mL mililitro
mM milimolar
mm milímetro

mmHg milímetro de mercúrio mN/mm milinewton/milímetro

NADPH oxidase Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

Oxidase

NO Óxido Nítrico

ob gene ob

OB grupo obeso

OB+LOS grupo obeso tratado com losartana

PAI-1 Plasminogen Activator Inhibitor-1

pM picomolar

PMSF Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PVAT Tecido Adiposo Perivascular

PVAT- anéis sem PVAT
PVAT+ anéis com PVAT
Rmax resposta máxima

RNAm Ácido Ribonucleico mensageiro

rpm rotações por minuto

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de

Laboratório

SBEM Sociedade Brasileira de Endocrinologia e

Metabologia

SRAA Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

TNF-α Fator de Necrose Tumoral- α

UCP-1 Uncoupling Protein-1

USP Universidade de São Paulo

V Volt

VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

WHO World Human Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Obesidade	19
1.2 Tecido adiposo	21
1.3 Tecido adiposo perivascualr (PVAT)	24
1.4 Sistema renina-angiotensina-aldosterona	26
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	29
3 OBJETIVO	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Indução da obesidade	31
4.3 Tratamento com antagonista do receptor AT1	31
4.4 Caracterização do modelo de obesidade	32
4.4.1 Ganho de massa corpórea e consumo de ração	32
4.4.2 Glicemia	32
4.5 Reatividade vascular	32
4.5.1 Artéria mesentérica de resistência	33
4.5.1.1 Normalização das artérias de resistência	33
4.5.5 Aorta torácica	34
4.5.6 Protocolo experimental	34
4.6 Western blotting	35
4.7 Análise estatística	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Caracterização do modelo de obesidade	38
5.1.1 Evolução ponderal e consumo de ração e calorias	38
5.1.2 Índice de Lee, conteúdo de gordura e massa magra	39
5.1.3 Glicemia	40
5.2 Reatividade vascular em artérias mesentéricas	41
5.2.1 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina p	elo
PVAT	42
5.2.2 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo P\	/AT
na presença do antagonista do receptor AT1 losartana	44

5.2.3 Participação da NADPH oxidase na modulação da resposta
vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT45
5.2.4 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT
na presença do antagonista do receptor AT2 PD123,319 46
5.2.5 Participação do NO na modulação da resposta vasoconstritora à
noradrenalina pelo PVAT 47
5.3 Reatividade vascular em aorta torácica 49
5.3.1 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo
PVAT 49
5.3.2 Modulação da resposta vasoconstritora à serotonina pelo PVAT 50
5.4 Conteúdo proteico dos receptores de Ang II e eNOS 52
5.4.1 Conteúdo proteico do receptor AT1 em artérias mesentéricas 52
5.4.2 Conteúdo proteico do receptor AT2 em artérias mesentéricas 53
5.4.3 Conteúdo proteico da enzima eNOS em artérias mesentéricas 54
5.4.4 Conteúdo proteico da enzima eNOS em PVAT de artérias
mesentéricas 55
6 DISCUSSÃO 56
7 CONCLUSÃO 64
REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Durante séculos, a raça humana se esforçou para superar a escassez de alimentos, doenças e um ambiente hostil. Com o início da revolução industrial, as grandes potências entenderam que o aumento do tamanho do corpo era um importante fator político e social. As potências militares e econômicas dos países foram criticamente dependentes do tamanho do corpo e força das novas gerações. Essa alteração na distribuição do índice de massa corporal (IMC) teve um impacto importante na sobrevivência e produtividade da população, implicando em um papel central no desenvolvimento econômico e industrial (Caballero, 2007).

Dados históricos indicam que a altura e o peso aumentaram progressivamente, principalmente durante o século 19. Durante o século 20, as populações dos países com melhores condições começaram a ganhar mais peso do que altura, resultando no aumento da média do IMC. Nos anos 2000, a raça humana alcançou um grande marco histórico, quando pela primeira vez na evolução humana o número de adultos com excesso de peso superou o número daqueles abaixo do peso. O excesso de peso é hoje amplamente reconhecido como uma das principais ameaças para a saúde na maioria dos países, assim como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e hipertensão arterial (Caballero, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso, correspondendo aproximadamente a 39% da população adulta, e dentre esses, aproximadamente 13%, ou seja, 600 milhões de adultos estavam obesos. O Ministério da Saúde revelou que, no Brasil, o índice de indivíduos acima do peso segue em crescimento no país – e em 2014, mais da metade da população (52,5%) apresentou excesso de peso, enquanto que dentre esses, 17,9% já eram obesos (Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO, 2015). A maior parte da população mundial vive em países onde o excesso de peso e obesidade matam mais pessoas do que o baixo peso (isso inclui todos

os de alta renda e a maioria dos países de renda média) (World Health Organization – WHO, 2015).

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia – SBEM, 2016). O desenvolvimento da obesidade é atribuído a um desequilíbrio entre o consumo e o gasto energético e, apesar da etiologia da obesidade ser multifatorial, seu desenvolvimento pode estar mais associado a fatores comportamentais, tais como um estilo de vida sedentário com uma ingestão excessiva de alimentos com altos níveis de gorduras e carboidratos, do que ao genótipo individual (Bloor, Symonds, 2014).

Um parâmetro de medida para a obesidade é o IMC, que consiste no peso de uma pessoa (em quilogramas) dividido pelo quadrado da sua altura (em metros) (WHO, 2015). A classificação do IMC para adultos (entre 18 e 85 anos de idade) define que um indivíduo está com sobrepeso quando o IMC está entre 25 e 29,9, e obeso quando o IMC é maior do que 30 (Stapleton et al., 2008).

Desde as últimas décadas, a obesidade vem sendo considerada como um problema de saúde pública associado a diversas condições incluindo a resistência à insulina, diabetes, doença renal crônica, aterosclerose, hipertensão e outras doenças cardiovasculares (Leal, Mafra, 2013). Uma avaliação precisa dos riscos e consequências relacionados à obesidade depende da quantidade de gordura corporal, distribuição e função dos adipócitos no corpo (Haberka, Gasior, 2015; Meijer et al., 2011).

Dessa forma, a relação cintura/quadril e a circunferência abdominal são parâmetros importantes na caracterização da obesidade, sendo indicativos de acúmulo de gordura visceral e fatores de risco para o desenvolvimento de comorbidades, já que o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares está mais associado à adiposidade no depósito visceral do que no depósito subcutâneo (Fitzgibbons, Czech, 2014; Wang et al., 2008). O mecanismo de aumento desse risco pode ser pelo fato de que o depósito visceral é metabolicamente ativo, secretando diversas substâncias vasoativas que podem contribuir para um risco cardiometabólico (Fox et al., 2007).

1.2 Tecido adiposo

O tradicional ponto de vista que o tecido adiposo é apenas um reservatório de energia já não é mais válido. Desde 1987, o tecido adiposo é identificado como o maior local para metabolismo dos esteroides sexuais e produtor da adipsina, um fator endócrino que é pouco expresso em camundongos obesos (Flier et al., 1987). Além de ser considerado como o principal reservatório energético, participando da homeostasia energética, o tecido adiposo também participa da proteção mecânica visceral contra traumas externos, regulação hormonal e manutenção da temperatura do corpo (Fonseca et al., 2006).

A identificação e caracterização da leptina em 1994, um produto do gene ob, também conhecido como *Lep*, estabeleceu o tecido adiposo como um órgão endócrino, devido à sua função de secretar substâncias com efeitos biológicos importantes, chamadas de adipocinas (Kershaw, Flier, 2004).

As adipocinas podem atuar localmente, de forma parácrina ou autócrina, bem como sistemicamente, atuando de forma endócrina (Gao, 2007; Kershaw, Flier, 2004).

As adipocinas incluem hormônios, citocinas e outras proteínas com funções biológicas específicas (Vázquez-Vela et al., 2008). Os processos biológicos que sofrem influências das adipocinas incluem a homeostasia energética (leptina), sensibilidade à insulina e regulação da homeostasia da glicose (adiponectina e resistina), inflamação (IL-6, fator de necrose tumoral- α – TNF- α , IL-1 β e MCP-1), reatividade vascular (leptina, resistina, TNF- α , adiponectina), regulação da pressão arterial (angiotensinogênio), coagulação (inibidor do ativador de plasminogênio-1 – PAI-1) e angiogênese (fator de crescimento endotelial vascular – VEGF) (Maenhaut, Voorde, 2011; Payne et al., 2011).

Microscopicamente, dois tipos de adipócitos podem ser distinguidos, os adipócitos marrons que tem um conteúdo intracelular com muitas mitocôndrias, e os adipócitos brancos, com muito menos conteúdo mitocondrial. Dessa maneira, dois tipos de tecido adiposo podem ser identificados em mamíferos no aspecto macroscópico: tecido adiposo marrom, que contém predominantemente adipócitos marrons e uma rede de capilares amplamente

distribuída; e o tecido adiposo branco, que contém predominantemente adipócitos brancos e é pobremente vascularizado (lkeoza et al., 2010). Nos últimos anos, foram identificados também adipócitos beges, um tipo de adipócito que possui capacidade de expressar a proteína desacopladora-1 (UCP-1), que até recentemente era descrito como o único marcador para os adipócitos marrons, porém não possui todas as características moleculares dos adipócitos marrons (Waldén et al., 2011).

O tecido adiposo branco possui um tecido conectivo frouxo com uma vasculatura organizada e inúmeras funções de amortecimento, isolamento e estoque lipídico. Atua como um órgão endócrino, pois secreta um grande número de adipocinas. Os adipócitos brancos são células uniloculares que contém um grande vacúolo lipídico, ocupando aproximadamente 90% do citoplasma, com o núcleo localizado na periferia da célula. Ácidos graxos não-esterificados acumulam-se nos adipócitos brancos e são esterificados em triacilgliceróis. Quando o organismo necessita de energia, os triacilgliceróis sofrem lipólise e são hidrolisados através da enzima lipase lipoproteica em glicerol e ácidos graxos na circulação, predominantemente para usos no músculo esquelético e fígado (Bloor, Symonds, 2014).

Os precursores dos adipócitos, os pré-adipócitos, são capazes de se proliferarem, porém o número de adipócitos no tecido permanece constante, pois assim como os pré-adipócitos são recrutados para tornarem-se células maduras, os adipócitos maduros, que não são capazes de proliferarem, sofrem apoptose na mesma proporção (Arner et al., 2010).

Durante períodos de excesso de captação de energia, os adipócitos brancos sofrem uma expansão em seu vacúolo, resultando em uma hipertrofia e aumento da deposição de gordura. Essa hipertrofia celular leva a um desequilíbrio lipolítico e lipogênico, levando a uma disfunção na sinalização endócrina, resultando em um aumento do risco do desenvolvimento da obesidade e inflamação e das comorbidades metabólicas e cardiovasculares (Vázquez-Vela et al., 2008).

Em humanos, o tecido adiposo branco é amplamente disperso em dois principais depósitos de gordura, o depósito subcutâneo – predominantemente no tronco; e visceral – que compreende principalmente as áreas retroperitoneal, mesentérica e omental. Em adição, depósitos menores de

tecido adiposo circundam o coração, vasos sanguíneos e os rins, sendo conhecidos como depósitos epi/pericárdico, perivascular e perirenal, respectivamente (Bloor, Symonds, 2014).

Além desses depósitos, os roedores possuem também depósitos adicionais relativamente grandes, como os depósitos gonadal, onde o tecido adiposo é branco, inguinal, onde o tecido adiposo é bege e interscapular, onde o tecido adiposo é marrom (Bloor, Symonds, 2014; Thalmann, Meier, 2007).

O tecido adiposo marrom é encontrado em recém-nascidos e adultos, principalmente nas regiões cervicais e supraclaviculares, fornecendo proteção contra a exposição ao frio através da geração de calor (termogênese), que acontece a partir da ação da enzima UCP-1, localizada na membrana interna de mitocôndrias do adipócito marrom (Cannon, Nedergaard, 2012).

Os adipócitos marrons são altamente vascularizados, multiloculares, pois possuem várias vesículas lipídicas com tamanhos variados, e apresentamse em um tamanho menor em relação aos adipócitos brancos. Diferentemente dos adipócitos brancos, os adipócitos marrons apresentam um grande número de mitocôndrias, fazendo com que a coloração do tecido seja marrom e mais escura (Bloor, Symonds, 2014).

Os adipócitos beges são adipócitos intermediários que possuem algumas propriedades dos adipócitos marrons, mas com uma origem completamente independente, que ainda não foi bem estabelecida (Ishibashi, Seale, 2010). Quando os receptores β -adrenérgicos dos adipócitos marrons são ativados pela noradrenalina, eles estimulam a lipólise e a produção de calor. Em depósitos brancos, a exposição prolongada ao frio ou agonistas β_3 -adrenérgicos causa uma transdiferenciação no tecido adiposo de branco para bege, fazendo com que esse adipócito possa, por exemplo, produzir calor (Seale et al., 2009).

Quanto à sua composição, o tecido adiposo é principalmente composto por adipócitos, representando aproximadamente 50% das células totais. Porém, outros tipos celulares participam do crescimento e da função do tecido adiposo, incluindo os pré-adipócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células vasculares. Os adipócitos, os pré-adipócitos e os macrófagos são responsáveis pela secreção de adipocinas (Ouchi et al., 2011).

1.3 Tecido adiposo perivascular (PVAT)

Em todo o organismo, a maioria das artérias e veias com um diâmetro igual ou maior do que 100 µm está em contato com adipócitos, com exceção da microcirculação cerebral. O termo "tecido adiposo perivascular" (PVAT) referese ao tecido adiposo que circunda os vasos, independente da sua localização (Meijer et al., 2011).

O PVAT é situado ao redor da camada adventícia, a camada mais externa do vaso sanguíneo (Huang et al., 2008). Os adipócitos perivasculares não são separados do vaso por qualquer camada ou lâmina elástica, então não existe uma barreira anatômica entre eles (Rajsheker et al., 2011). Dessa forma, os mediadores secretados pelo PVAT podem ter fácil acesso às células do músculo liso do vaso sanguíneo (Chatterjee et al., 2009).

A estrutura e a composição do PVAT não são uniformes nos diversos leitos vasculares (Voorde et al., 2014). O PVAT é constituído por adipócitos, fibroblastos, células-tronco, mastócitos e inervação (Eringa et al., 2012; Houben et al., 2011; Meijer et al., 2011).

Em aorta torácica, o PVAT se assemelha ao tecido adiposo marrom, com adipócitos multiloculares, grande número de mitocôndrias e expressão da UCP-1, enquanto que em artérias mesentéricas (tradicionalmente classificado como tecido adiposo branco visceral), artéria femoral e aorta abdominal o PVAT se assemelha ao tecido adiposo branco, com grandes adipócitos uniloculares e menor vascularização (Brown et al., 2014; Gálvez-Prieto et al., 2012; Oriowo, 2014; Police et al., 2009; Szasz et al., 2013).

Inicialmente, o PVAT era considerado apenas uma estrutura de suporte para a vasculatura (Lee et al., 2014). A primeira evidência sugerindo que o PVAT poderia ter outras funções, tal como modular o tônus do músculo liso vascular, foi previsto por Soltis e Cassis, em 1991, que relataram que o PVAT atenuava significativamente a contração induzida pela noradrenalina em aorta de ratos (Oriowo, 2014; Soltis, Cassis, 1991). Os mecanismos para essa atenuação na contração pelo PVAT não estão totalmente compreendidos, mas o envolvimento do óxido nítrico (NO) e a liberação de um fator relaxante com identidade desconhecida, chamado de fator relaxante derivado do PVAT (FRDP) têm sido considerados (Huang et al., 2008).

Em condições fisiológicas, o PVAT parece liberar diversas substâncias vasoativas, como o FRDP, a angiotensina-(1-7), adiponectina, H_2O_2 , leptina e NO, que provocam um efeito anticontrátil benéfico para a função vascular e para a manutenção da resistência vascular (Fernández-Alfonso et al., 2013).

Gao e colaboradores (2005) demonstraram que o efeito anticontrátil do PVAT era perdido em ratos que foram expostos intrauterinamente à nicotina e apresentaram obesidade na idade adulta. Esse estudo sugere que, na obesidade, a expansão do PVAT pode estar associada a mudanças na expressão dos fatores derivados do PVAT, resultando em alterações na função vascular. Essa redução nas ações do PVAT pode ocorrer provavelmente devido ao aumento da ação pró-inflamatória dos macrófagos e da alteração na produção de adipocinas que acontece na obesidade (Chatterjee et al., 2009).

Na obesidade, algumas adipocinas pró-inflamatórias estão altamente expressas no PVAT, influenciando a função vascular, função endotelial, estado redox, rigidez vascular e migração do músculo liso. Essas adipocinas estimulam a migração de células imunológicas para a parede vascular, contribuindo para a inflamação que pode ser vista na aterosclerose (Britton, Fox, 2011).

Além do efeito anticontrátil, o PVAT pode também aumentar a contração vascular. Lee e colaboradores (2014) avaliaram o efeito do PVAT na função vascular em ratos Wistar adultos, incubando anéis de aorta torácica com meio condicionado com massas iguais de PVAT. Eles demonstraram que, na presença de meio condicionado com PVAT, a resposta vasoconstritora à fenilefrina foi aumentada. O mesmo grupo estudou ainda o efeito do PVAT na função endotelial e, a partir disso, apresentaram dados levantando a hipótese de que um fator desconhecido liberado pelo PVAT se difunde até o endotélio e promove um aumento na expressão de caveolina-1, um regulador negativo da eNOS (NOS endotelial). Dessa forma, a caveolina-1 provavelmente compete pelo sítio de ligação da eNOS com cálcio/calmodulina, resultando na inativação da eNOS, inibição da produção de NO e aumento da vasoconstrição.

O PVAT, em conjunto com componentes vasculares, é uma rica fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), e sabe-se que essas EROs exercem efeitos vasomotores que modulam a resposta vascular. As EROs derivadas do PVAT podem ter um importante papel na modulação da função vascular

mediada pelo PVAT. Gao e colaboradores (2007) demonstraram que o superóxido derivado do PVAT potencializou a vasoconstrição à noradrenalina em artérias mesentéricas de ratos. Além disso, todos os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), exceto a renina, estão presentes no PVAT, embora existam diferenças entre o PVAT marrom e branco (Eringa et al., 2014). Altos níveis de Ang II estavam presentes no PVAT de artérias mesentéricas de ratos magros e normotensos (Gálvez-Prieto et al., 2008).

Desse modo, os estudos com o PVAT abriram um novo campo na biologia vascular. Um ambiente adequado para as células da parede vascular é vital para que a função vascular permaneça normal. O desequilíbrio da liberação dos fatores derivados do PVAT, como pode acontecer na obesidade, pode ser um importante fator de risco para as alterações vasculares (Miao, Li, 2011).

1.4 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

O SRAA tem um importante papel na regulação da pressão arterial por modular o tônus vascular, a estrutura vascular e a função renal (Paul et al., 2006). Também está fortemente associado à patogênese de diversas doenças cardiovasculares (Cat, Touyz, 2011).

O substrato da renina, o angiotensinogênio, é clivado pela renina, uma enzima produzida nas células justaglomerulares dos rins a partir da pré-prórenina, que é processada em pró-renina e só então em renina ativa, que é secretada na circulação. No sangue, a renina cliva o angiotensinogênio, formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I), que é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA), encontrada principalmente em células endoteliais do pulmão, formando o octapeptídeo angiotensina II (Ang II), o principal componente do sistema. Em adição à clivagem da Ang I, a ECA metaboliza a bradicinina, um potente vasodilatador, gerando um peptídeo inativo. Dessa forma, a ECA tem duas funções na vasculatura: produzir a Ang II, um potente vasoconstritor, e degradar a bradicinina, um importante vasodilatador (Cat, Touyz, 2011; Gálvez-Prieto et al., 2008).

A Ang II é considerada o principal peptídeo bioativo do SRAA, com diversas ações fisiológicas e efeitos sobre o coração, rim, glândula adrenal, sistema vascular e sistema nervoso central. Estimulação crônica e superativação desse sistema produzem efeitos deletérios nas funções cardiovasculares e renais (Balakumar, Jagadeesh, 2014; Higuchi et al., 2007).

Os efeitos vasculares, cardíacos, renais e adrenais da Ang II são mediados via ativação de dois receptores acoplados à proteína G: o receptor para Ang II tipo 1 (AT1) e o receptor para Ang II tipo 2 (AT2), que medeiam respostas geralmente em direções opostas (Cat, Touyz, 2011). O receptor AT1 medeia a maioria dos efeitos conhecidos da Ang II, que incluem a vasoconstrição, aumento da sede, crescimento celular, geração de EROs e inflamação, hipertrofia cardíaca e vascular, estímulo da secreção de aldosterona, entre outros efeitos. As ações do receptor AT2 são menos claras, porém contrabalanceiam algumas ações do receptor AT1. O receptor AT2 está envolvido em processos fisiológicos como o desenvolvimento e remodelamento tecidual (por inibição do crescimento celular e estimulação da apoptose), regulação da pressão arterial (através da vasodilatação e geração de NO), natriurese e atividade neuronal (Lemarié, Schiffrin, 2010).

Até recentemente, o SRAA era considerado um processo linear e a Ang II era aceita como o principal peptídeo efetor. No entanto, a visão convencional do SRAA mudou significantemente em quatro níveis principais: (1) identificação do receptor de renina/pró-renina, (2) reconhecimento da função de diversos peptídeos ativos derivados da Ang II, (3) SRAA intracelular e (4) existência do SRAA tecidual (Cat, Touyz, 2011).

Durante a última década, foi demonstrada a existência de um SRAA local no tecido adiposo (Gálvez-Prieto et al., 2008). A produção local de Ang II no tecido adiposo está relacionada com uma variedade de doenças, incluindo hipertensão arterial, aterosclerose e doenças renais. A obesidade induzida por dieta aumentou as concentrações plasmáticas de Ang II e elevou a pressão arterial de camundongos machos (Yiannikouris et al., 2012). Outro estudo demonstrou que o estresse oxidativo influencia o conteúdo de RNAm de angiotensinogênio no tecido adiposo de humanos e roedores, sendo que os níveis de RNAm de angiotensinogênio estavam diminuídos em obesos, quando havia elevado conteúdo de EROs (Okada et al., 2010).

Gálvez-Prieto e colaboradores (2008) desenvolveram um estudo comparativo entre a expressão dos componentes do SRAA no PVAT marrom e branco de ratos Wistar, utilizando a aorta torácica e a gordura mesentérica, respectivamente. Eles observaram que os componentes do SRAA estão expressos de forma diferente nos dois tipos de PVAT. Além disso, nosso grupo mostrou que a obesidade regula diferentemente o RNAm dos componentes do SRAA no PVAT da aorta torácica e de artérias mesentéricas (Inada et al., 2016). Dessa forma, o SRAA pode modular diferentemente a função vascular, através da liberação de fatores diferentes dependendo do PVAT de cada leito vascular.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A morfologia do PVAT varia de acordo com o leito vascular, por exemplo, o tecido adiposo do segmento torácico da aorta é marrom, enquanto o tecido adiposo é branco no segmento abdominal e artérias mesentéricas. A ação anticontrátil do PVAT é perdida na obesidade. No entanto, a avaliação da modulação das respostas vasculares pelo PVAT não discrimina o leito vascular e o conhecimento que temos atualmente foi gerado a partir de estudos que utilizaram PVAT marrom, porque a aorta torácica é a mais utilizada nesses estudos.

Considerando que os componentes do SRAA são diferentemente expressos no PVAT branco e marrom e a obesidade parece regular diferentemente o conteúdo de RNAm dos componentes do SRAA no PVAT branco e marrom, a hipótese do presente estudo é que a obesidade afeta diferentemente a ação anticontrátil do PVAT branco e marrom.

3 OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da obesidade sobre a modulação da resposta contrátil pelo PVAT da aorta torácica (marrom) e de artérias mesentéricas de resistência (branco) e se o SRAA participa nesse efeito promovido pela obesidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão Experimental no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) sob o número 195, folha 116, livro 02.

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6 com 4 semanas de idade, provenientes do Biotério Central, situado na Faculdade de Medicina/USP e divididos em dois grupos: I) camundongos que receberam ração padrão (Controle); II) camundongos que receberam dieta hiperlipídica (Obeso). Os camundongos foram acondicionados em caixas de polipropileno, que foram alojadas no Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia (ICB/USP) em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro (12 horas/ 12 horas). Os camundongos tiveram livre acesso à ração e água.

4.2 Indução da obesidade

Para a indução da obesidade, foi utilizada ração hiperlipídica, cujo conteúdo calórico é de 5,4 kcal/g (carboidrato, 25,9%; proteína, 14,9%; gordura, 59%) (PragSoluções, Brasil), baseado no estudo de De Souza e colaboradores (2005). A ração padrão apresenta conteúdo calórico de 3,8 kcal/g (carboidrato, 70%; proteína, 20%; gordura, 10%) (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S.A., Brasil). Camundongos foram submetidos às dietas padrão ou hiperlipídica durante 16 semanas, a partir da 4ª semana de idade.

4.3 Tratamento com antagonista do receptor AT1

Alguns camundongos C57BL/6 do grupo obeso e do grupo controle foram tratados com antagonista do receptor AT1 de angiotensina II (losartana;

0,06 mg/L para o grupo controle e 0,1 mg/L para o grupo obeso) na água de beber por 30 dias, a partir da 12ª semana de dieta (Martinez et al., 2005).

4.4 Caracterização do modelo de obesidade

4.4.1 Ganho de massa corpórea e consumo de ração

Os camundongos foram pesados semanalmente e o consumo semanal médio de ração e calorias foi determinado ao longo das 16 semanas de tratamento com as dietas.

A massa corpórea na 16ª semana do início da dieta foi corrigida pelo comprimento naso-anal para determinar o índice de Lee {[massa corporal^{1/3} (g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100}. Ao final das 16 semanas de dieta, a massa dos depósitos de gorduras periepididimal e retroperitoneal e do músculo gastrocnêmio foi determinada e corrigida pela massa corpórea.

4.4.2 Glicemia

O alimento foi retirado às 06 horas da manhã e, após 4 horas, a glicemia foi determinada por fitas reativas (OneTouch-Ultra) e glicosímetro (OneTouch-Lifescan) (Johnson & Johnson, EUA), utilizando-se amostras de sangue obtidas por punção caudal de animais acordados.

4.5 Reatividade vascular

Os animais foram anestesiados com mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg) (i.p.) e o intestino e aorta torácica foram removidos e mantidos em solução nutriente de Krebs-Henseleit a 4 °C (composição em mM: NaCl 130; KCl 4,7; NaHCO₃ 14,9; CaCl₂.2H₂O 1,6; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄.7H₂O 1,17; EDTA 0,026 e glicose 5,5).

4.5.1 Artéria mesentérica de resistência

Para o estudo da reatividade vascular em anéis de artérias mesentéricas de resistência foi utilizado o método descrito por Mulvany e Halpern (1977). O primeiro ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e cortado em segmentos de 2,0 mm de comprimento com auxílio de um microscópio de dissecação. Alguns anéis permaneceram intactos, a fim de avaliar a reatividade na presença do PVAT. Dois fios de tungstênio (20 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e fixados em um miógrafo de força (MultWire Myograph System 620M, DMT, Dinamarca) para o estudo da tensão isométrica. Esse miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab/ 8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador.

4.5.1.1 Normalização das artérias de resistência

O propósito do procedimento de normalização é determinar a circunferência interna de um segmento vascular na qual o desenvolvimento de força é máximo (IC1). Para tanto, determina-se a circunferência interna (IC100) que o segmento vascular totalmente relaxado teria em uma determinada pressão transmural. Para artérias mesentéricas de resistência, a pressão transmural alvo é de 100 mmHg, que corresponde a 13,3 kPa (Mulvany e Halpern, 1977).

Após o período de aquecimento dos segmentos vasculares (15 minutos) em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4 e a 37 °C), gaseificado com 95% de O_2 e 5% de CO_2 , os anéis foram distendidos de forma gradativa e a leitura da distância entre os dois arames (μ m) e da força aplicada foram registradas a cada ponto. Utilizando-se programa de normalização (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália), foi calculada a circunferência interna (μ m), a partir da distância entre os dois arames e do diâmetro desses arames, e a tensão da parede (mN/mm), a partir da divisão da força pelo comprimento da parede (duas vezes o comprimento do segmento vascular). A partir da relação de Laplace [P = tensão da parede/(circunferência interna/(2.pi))], foi estimada a pressão que seria necessária para distender o segmento vascular a cada

circunferência interna calculada. Ajustando a equação de Laplace na curva gerada pela tensão na parede do vaso plotada contra a circunferência interna, foi determinada a IC100. A IC1 foi calculada a partir da IC100 por meio da fórmula IC1 = 0,90 x IC100, dando uma circunferência interna na qual a produção de força ativa bem como a sensibilidade do segmento a agonistas é máxima. O diâmetro interno normalizado foi calculado dividindo-se IC1 por *pi*.

4.5.2 Aorta torácica

A aorta torácica foi seccionada em anéis transversais de 2,0 mm. Alguns anéis foram dissecados e outros permaneceram com o PVAT intacto. Os anéis foram montados em ganchos de 200 μm de diâmetro, fixados em cubas de miógrafos de força para estudo da tensão isométrica contendo solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4, 37 °C) gaseificado com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Esse miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador. A tensão basal foi ajustada para 1 g e os anéis permaneceram nessa tensão durante 1 hora para estabilização.

4.5.3 Protocolo experimental

Após 30 minutos do processo de normalização, os anéis de artérias mesentéricas foram contraídos com a administração de cloreto de potássio (KCI, 120 mM), com a finalidade de avaliar a integridade do músculo liso. Após cada estímulo com KCI, os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit. A administração de KCI foi repetida por mais duas vezes com intervalo de 15 minutos entre cada administração.

Após 15 minutos da última administração de 120 mM de KCI (para os anéis de artérias mesentéricas) ou o período de estabilização (anéis de aorta torácica), as preparações foram pré-contraídas com noradrenalina (1-10 μΜ), e a integridade do endotélio foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (1 μΜ) (vasodilatador dependente do endotélio) em induzir relaxamento. Os anéis foram lavados com solução de Krebs-Henseleit e após 30 minutos de

estabilização, curvas concentração-resposta para noradrenalina foram realizadas (10 pM - 30 μ M) em anéis de aorta torácica e artérias mesentéricas, sendo que em aorta torácica também foram realizadas curvas concentração-resposta para serotonina.

Alguns anéis de artérias mesentéricas foram incubados com o inibidor da NO sintase L-NAME (100 μ M; Sigma, EUA), inibidor da NADPH oxidase apocinina (10 μ M; Sigma, EUA), na presença dos antagonistas do receptor AT-1 losartana (10 μ M; Sigma, EUA) e receptor AT-2 PD 123,319 (1 μ M; Sigma, EUA).

Os resultados para as curvas concentração-resposta cumulativas aos agentes vasoconstritores foram expressos em relação à contração do KCl 120 mM (%) para artéria mesentérica e aumento da tensão (g) para aorta torácica.

4.6 Western Blotting

O conteúdo proteico para os receptores AT1 e AT2 nas artérias mesentéricas nos grupos controle e obeso e para a eNOS tanto nas artérias mesentéricas, quanto no PVAT do leito mesentérico nos grupos controle e controle tratado com losartana, obeso e obeso tratado com losartana, foi avaliado pelo ensaio de Western Blotting. Amostras de artérias mesentéricas e PVAT do leito mesentérico foram dissecadas cuidadosamente, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C até o processamento. Posteriormente, os tecidos mantidos a -80 °C foram pulverizados em nitrogênio líquido, homogeneizados e incubados por 30 minutos a 4 °C em 30 µL de tampão de lise específico para receptores AT1 e AT2 (Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM; aprotinina 0,01 mg/mL; PMSF 2 mM; sacarose 10%; inibidor de proteases) ou 30 μL de tampão de lise RIPA para o PVAT de animais controles e 80 μL para o PVAT de animais obesos (Triton-X-100 1%; Tris 100 mM, pH 7,4) contendo pirofosfato de sódio (100 mM), fluoreto de sódio (100 mM), EDTA (10 mM), ortovanadato de sódio (10 mM), PMSF (2 mM) e aprotinina (0,01 mg/mL) para a eNOS.

Os extratos teciduais do PVAT do leito mesentérico foram centrifugados (3.500 rpm a 4 °C por 5 minutos) para a separação da gordura. Posteriormente,

os extratos teciduais do PVAT foram centrifugados (12.000 g a 4 °C por 30 minutos) para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e utilizado para quantificação do conteúdo proteico total, utilizando o método de BCA (ácido bicincônínico, Thermo Scientific). Para o ensaio de *Western Blotting*, as amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotreitol, 200 mM) e aquecidas em banho seco a 100 °C por 5 minutos. Foram utilizados 20 μg de proteínas totais para a avaliação da eNOS e receptores AT1 e AT2 em artérias mesentéricas e 50 μg de proteínas totais para a avaliação da eNOS em PVAT do leito mesentérico, sendo estas submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).

Para os receptores AT1 e AT2, a transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de PVDF (GE-Armsham), por 1 hora e 30 minutos a 100 V. Já para a eNOS, a transferência das proteínas foi feita eletricamente por 12 horas a 4 °C a 230 mA.

Após a transferência, verificou-se a eficiência da transferência através da incubação da membrana com ácido acético (1%) por 5 minutos, seguida de incubação com o corante Ponceau por 20 minutos e nova incubação com ácido acético (1%) por 5 minutos. Após lavagem com água destilada e TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%), no ensaio experimental para a eNOS, a membrana foi incubada com solução bloqueadora constituída de albumina (3% em TBS-T) (Sigma Aldrich) por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo anti-eNOS (BD Biosciences) (1:1000 em solução bloqueadora) por 12 horas a 4 °C. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-camundongo (1:2000) para eNOS foi incubado por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente.

Para o receptor AT1, a membrana foi incubada com leite desnatado Molico® (1% em TBS-T) por 1 hora em temperatura ambiente para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo anti-AT1 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000) por 12 horas a 4 °C. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-coelho (1:10000) foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Para o receptor AT2, a membrana não foi incubada em bloqueio, sendo incubado diretamente com o

anticorpo primário anti-AT2 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000) por 12 horas a 4 °C. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-coelho (1:10000) foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

Logo após a incubação dos anticorpos secundários, as membranas foram incubadas com a solução de quimioluminescência, como descrito no protocolo do kit (Thermo Fisher Scientific). A emissão de luz foi detectada, visualizada e digitalizada por fotodocumentador GelLogic (Analitica), utilizandose o software Carestream. Essa intensidade foi normalizada pela intensidade de bandas coradas com o corante Ponceau conforme descrito por Romero-Calvo e colaboradores (2010).

4.7 Análise estatística

Os resultados são mostrados como média ± erro padrão da média. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias para medidas repetidas, quando apropriado, seguido de teste de múltiplas comparações Tukey ou Bonferroni, respectivamente. O nível de significância aceito foi p<0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo de obesidade

5.1.1 Evolução ponderal e consumo de ração e calorias

A Figura 1A mostra a evolução ponderal de camundongos alimentados com ração padrão (controle) e ração hiperlipídica (obeso) ao longo de 16 semanas. Camundongos alimentados com ração hiperlipídica passaram a apresentar maior ganho de massa corpórea do que os camundongos alimentados com ração padrão a partir da 3ª semana do início da dieta (Figura 1A). O tratamento com losartana durante as 4 últimas semanas da dieta não modificou o padrão do ganho de massa corpórea tanto de camundongos alimentados com ração padrão quanto os alimentados com ração hiperlipídica (Figura 1A).

O grupo que recebeu ração hiperlipídica apresentou menor consumo semanal médio de ração (Figura 1B) e calorias (Figura 1C) em relação ao grupo que recebeu ração padrão.

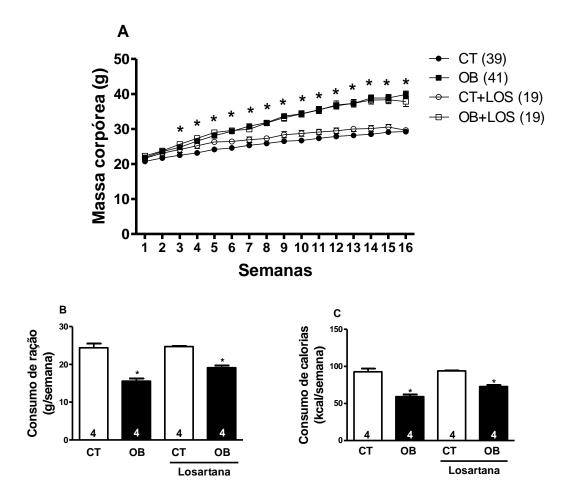


Figura 1 - Evolução ponderal (A) e consumo semanal médio de ração (B) e calorias (C) de camundongos alimentados com ração padrão (controle, CT) e ração hiperlipídica (obeso, OB) por 16 semanas, e que receberam losartana (LOS) ou não durante as 4 últimas semanas. Gráfico A: cada ponto representa média ± epm; * p < 0,05 versus CT e CT+LOS (ANOVA-duas vias); o número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Gráficos B e C: as barras representam média ± epm; * p < 0,05 versus CT e CT+LOS (ANOVA-uma via); os valores dentro das barras representam o número de gaiolas avaliadas, cada gaiola continha de 4 a 5 animais.

5.1.2 Índice de Lee, conteúdo de gordura e massa magra

Ao final de 16 semanas de dieta, camundongos alimentados com ração hiperlipídica (obeso) apresentaram maior massa corpórea (Figura 2A), índice de Lee (Figura 2B) e depósitos de gordura retroperitoneal (Figura 2C) e periepididimal (Figura 2D) e reduzida massa do músculo gastrocnêmio (Figura 2E) do que camundongos alimentados com ração padrão (controle). O tratamento com losartana não modificou esses parâmetros em nenhum dos grupos (Figura 2).

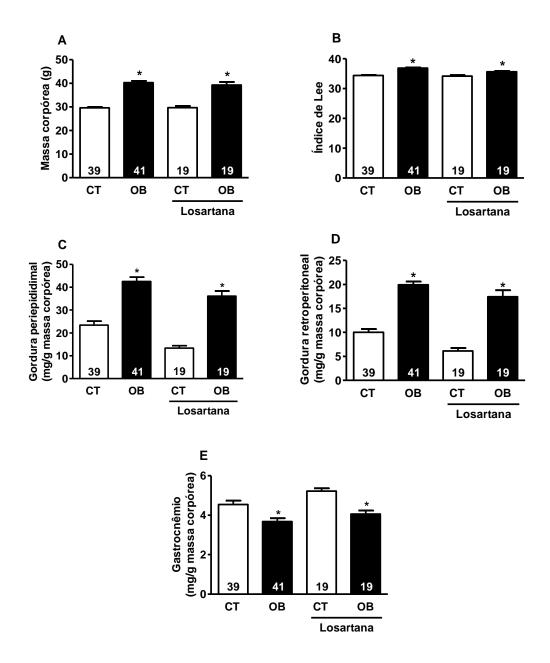


Figura 2 – Massa corpórea final (A), índice de Lee {[massa corpórea^{1/3} (g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100} (B) e massa dos depósitos de gordura retroperitoneal (C) e periepididimal (D) e do músculo gastrocnêmio (E) de camundongos alimentados com ração padrão (CT) e ração hiperlipídica (OB) por 16 semanas, tratados ou não com losartana. As barras representam média ± epm. * p < 0,05 versus controle (ANOVA-uma via). O número de animais avaliados encontra-se no interior das barras.

5.1.3 Glicemia

Camundongos alimentados com ração hiperlipídica por 16 semanas (obeso) apresentaram maior concentração sanguínea de glicose em relação aos camundongos alimentados com ração padrão (controle) (Figura 3). O

tratamento com losartana não alterou a concentração sanguínea de glicose, tanto no grupo controle como no grupo obeso (Figura 3).

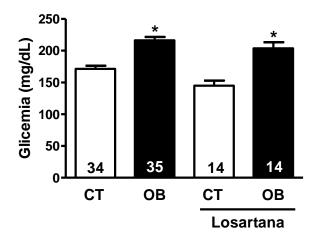


Figura 3 – Glicemia de camundongos alimentados com ração padrão (CT) e ração hiperlipídica (OB) por 16 semanas (A), tratados ou não com losartana. As barras representam média ± epm. * p < 0,05 versus CT (ANOVA-uma via). O número de animais avaliados encontra-se no interior das barras.

5.2 Reatividade vascular em artérias mesentéricas

O diâmetro interno e a resposta ao cloreto de potássio não foram diferentes entre os anéis estudados (Tabela 1). A massa de anéis com PVAT foi semelhante entre os dois grupos e o tratamento com losartana não modificou esse parâmetro (Tabela 2).

Tabela 1 – Características dos anéis de artérias mesentéricas

	Diâmetro interno (μm)	Tensão ativa ao KCI (mN/mm)	Massa dos anéis (mg)
CT – PVAT-	$184,30 \pm 7,51$	$0,45 \pm 0,07$	0.38 ± 0.04
OI -I VAI-	(47)	(15)	(26)
CT – PVAT+	$180,10 \pm 7,08$	$0,69 \pm 0,06$	$1,93 \pm 0,22*$
CIFVAIT	(45)	(11)	(26)
OB – PVAT-	$174,80 \pm 6,33$	$0,57 \pm 0,06$	0.36 ± 0.04
OD - I VAI-	(50)	(16)	(23)
OB – PVAT+	$160,60 \pm 6,34$	$0,51 \pm 0,06$	$2,44 \pm 0,47^*$
OB-1 VAIT	(48)	(15)	(23)
CT+LOS - PVAT-	193,50 ± 11,15	$0,63 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,02$
CITLOS - FVAI-	(17)	(12)	(16)

CT+LOS - PVAT+	191,60 ± 12,74	$0,57 \pm 0,08$	$1,75 \pm 0,18$ *
CITLOS - PVAIT	(16)	(12)	(16)
OB+LOS - PVAT-	$188,30 \pm 8,21$	$0,43 \pm 0,12$	0.31 ± 0.04
OBTEOS - I VAIT	(16)	(10)	(16)
OB+LOS - PVAT+	$178,90 \pm 7,98$	0.37 ± 0.07	$3,01 \pm 0,31*$
OBTLOS - FVAIT	(16)	(10)	(16)

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. LOS: losartana. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número de anéis avaliados encontrase entre parênteses.

5.2.1 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT

A presença do PVAT reduziu a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas no grupo controle, em relação aos anéis sem PVAT (Figura 6A, Tabela 2). No grupo obeso, a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi semelhante entre os anéis com e sem PVAT (Figura 6B, Tabela 2). No grupo controle tratado com losartana, a presença de PVAT reduziu a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (Figura 6C, Tabela 2). No grupo obeso tratado com losartana, a presença do PVAT também reduziu a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina (Figura 6D, Tabela 2).

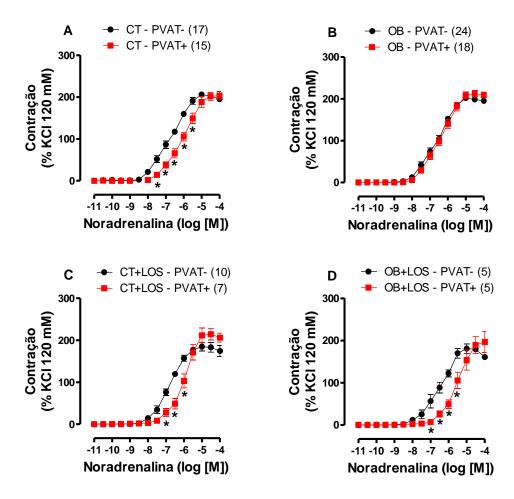


Figura 4 – Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não com losartana (LOS). * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, duas vias). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

Tabela 2 – Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de artérias mesentéricas à noradrenalina

	Rmax (% KCI)	Log EC50
CT – PVAT- (17)	200,40 ± 6,29	-6,84 ± 0,11
CT – PVAT+ (15)	$202,40 \pm 10,34$	-6,07 ± 0,11*
OB – PVAT- (24)	$193,70 \pm 4,84$	$-6,69 \pm 0,08$
OB – PVAT+ (18)	$208,80 \pm 6,90$	$-6,42 \pm 0,10$
CT+LOS – PVAT- (10)	$184,20 \pm 9,65$	$-6,90 \pm 0,11$
CT+LOS - PVAT+ (7)	$222,80 \pm 16,52$	$-6,01 \pm 0,13^*$
OB+LOS – PVAT- (5)	$179,30 \pm 10,48$	$-6,62 \pm 0,16$
OB+LOS - PVAT+ (5)	$199,50 \pm 25,47$	-5,51 ± 0,22*

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. LOS: losartana. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

5.2.2 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT na presença do antagonista do receptor AT1 losartana

Na presença de losartana na cuba, os anéis com PVAT apresentaram reduzida resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina no grupo controle, em relação aos anéis sem PVAT (Figura 5A, Tabela 3). No grupo obeso, a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi semelhante entre os anéis com e sem PVAT na presença de losartana na cuba (Figura 5B, Tabela 3).

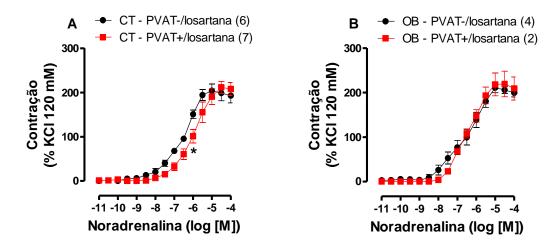


Figura 5 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e obesos (OB), incubados com losartana. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, duas vias). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

Tabela 3 – Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do antagonista do receptor AT1 losartana

	Rmax (% KCI)	Log EC50
CT – PVAT- /losartana (6)	195,50 ± 15,07	-6,58 ± 0,09
CT – PVAT+ /losartana (7)	210,10 ± 16,20	-6,01 ± 0,19*
OB – PVAT-/losartana (4)	$200,90 \pm 13,79$	$-6,56 \pm 0,23$
OB - PVAT+/losartana (2)	$205,10 \pm 30,40$	$-6,51 \pm 0,04$

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

5.2.3 Participação da NADPH oxidase na modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT

Na presença de apocinina, os anéis com PVAT apresentaram reduzida resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina no grupo controle em relação aos anéis sem PVAT (Figura 6A, Tabela 4). No grupo obeso, a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi semelhante entre os anéis com e sem PVAT (Figura 6B, Tabela 4).

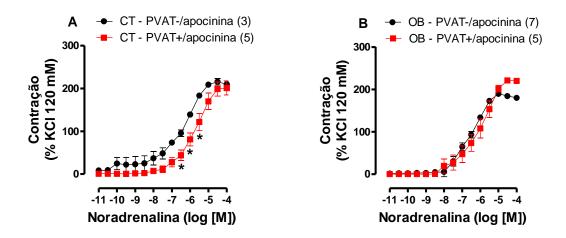


Figura 6 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e obesos (OB), incubados com apocinina. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, duas vias). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

Tabela 4 – Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do inibidor da NADPH oxidase apocinina

	Rmax (% KCI)	Log EC50
CT – PVAT- /apocinina (3)	209,60 ± 8,34	-6,32 ± 0,05
CT – PVAT+ /apocinina (5)	199,30 ± 16,27	-5,75 ± 0,19*
OB – PVAT- /apocinina (7)	185,20 ± 4,37	$-6,60 \pm 0,11$
OB - PVAT+ /apocinina (5)	$218,10 \pm 5,78$	$-6,14 \pm 0,34$

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

5.2.4 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT na presença do antagonista do receptor AT2 PD 123,319

Na presença do antagonista do receptor AT2 PD 123,319, a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina foi semelhante entre os anéis com e sem PVAT no grupo controle tratado com losartana (Figura 7A, Tabela 5). No grupo obeso tratado com losartana, a presença do antagonista PD 123,319 aumentou a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina em anéis com PVAT, em relação aos anéis sem PVAT (Figura 7B, Tabela 5).

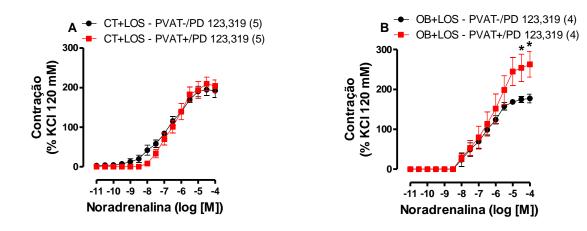


Figura 7 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e obesos (OB) tratados com losartana (LOS), incubados com PD 123,319. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, duas vias). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

Tabela 5 – Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do antagonista do receptor AT2 PD 123,319

	Rmax (% KCI)	Log EC50
CT+LOS – PVAT- / PD 123,319 (5)	187,00 ± 13,81	-6,81 ± 0,15
CT+LOS - PVAT+ / PD 123,319 (5)	$206,30 \pm 15,59$	$-6,53 \pm 0,14$
OB+LOS – PVAT- / PD 123,319 (4)	175,70 ± 10,55	$-6,81 \pm 0,27$
OB+LOS - PVAT+ / PD 123,319 (4)	$256,50 \pm 34,99*$	$-6,42 \pm 0,32$

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. LOS: losartana. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

5.2.5 Participação do NO na modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT

Para avaliar se a recuperação do efeito anticontrátil do PVAT no grupo obeso era dependente da via do NO, anéis de artérias mesentéricas com e sem PVAT foram incubados com o inibidor da NO sintase L-NAME. Na presença de L-NAME, a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina em anéis com PVAT de camundongos controles ainda foi menor do que naqueles sem PVAT (Figura 8A, Tabela 6). No grupo obeso, a resposta à noradrenalina permaneceu semelhante em anéis de artérias mesentéricas com e sem PVAT na presença do L-NAME (Figura 8B, Tabela 6).

No grupo controle tratado com losartana, a presença do L-NAME aumentou a resposta à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas com PVAT em relação aos anéis sem PVAT (Figura 8C, Tabela 6). Na presença de L-NAME, a resposta à noradrenalina foi semelhante em anéis de artérias mesentéricas com e sem PVAT de camundongos obesos tratados com losartana (Figura 8D, Tabela 6).

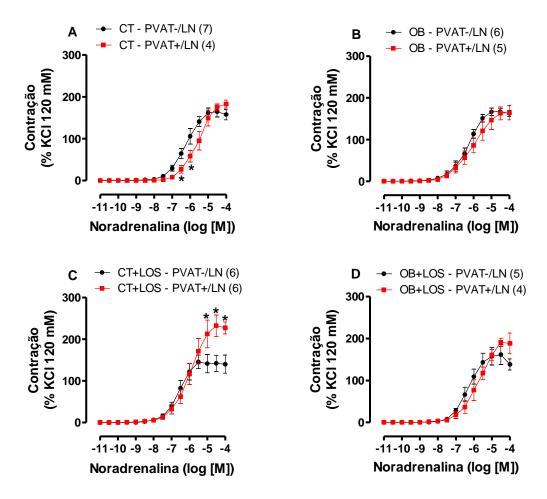


Figura 8 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não com losartana (LOS), incubados com L-NAME (LN). * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, duas vias). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

Tabela 6 – Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de artérias mesentéricas à noradrenalina na presença do inibidor da óxido nítrico sintase

	Rmax (% KCI)	Log EC50
CT – PVAT- /LN (7)	165,20 ± 12,43	-6,27 ± 0,10
CT – PVAT+ /LN (4)	$182,60 \pm 9,25$	$-5,56 \pm 0,22*$
OB – PVAT-/LN (6)	169,10 ± 8,75	$-6,38 \pm 0,12$
OB – PVAT+ /LN (5)	$169,30 \pm 14,34$	$-6,06 \pm 0,31$
CT+LOS – PVAT- /LN (6)	$147,40 \pm 20,41$	$-6,55 \pm 0,13$
CT+LOS - PVAT+ /LN (6)	241,40 ± 21,25*	$-5,93 \pm 0,25$
OB+LOS – PVAT- /LN (5)	$166,90 \pm 23,70$	$-6,36 \pm 0,13$
OB+LOS – PVAT+/LN (4)	$205,60 \pm 16,56$	$-5,77 \pm 0,26$

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. LOS: losartana. LN: L-NAME. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivo anel sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número entre parênteses refere-se ao número de artérias avaliadas.

5.3 Reatividade vascular em aorta torácica

A massa de anéis com PVAT de camundongos obesos foi maior do que a de anéis com PVAT de camundongos controles (Tabela 7).

Tabela 7 – Características dos anéis de aorta torácica

Massa dos anéis (mo		
CT – PVAT- (30)	0.23 ± 0.03	
CT – PVAT+ (29)	$1,52 \pm 0,10^*$	
OB – PVAT- (14)	0.16 ± 0.02	
OB – PVAT+ (14)	$4,20 \pm 0,56^{*}$	

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) e * p < 0,05 versus CT-PVAT+ (ANOVA, uma via). O número de anéis avaliados encontra-se entre parênteses.

5.3.1 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo PVAT

A presença do PVAT reduziu a resposta vasoconstritora induzida pela noradrenalina tanto no grupo controle (Figura 9A, Tabela 8), quanto no grupo obeso (Figura 9B, Tabela 8).

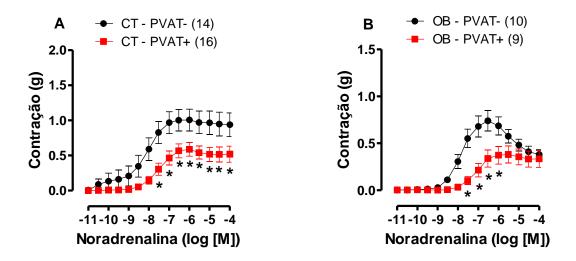


Figura 9 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta torácica com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e obesos (OB). * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, duas vias). O número entre parênteses refere-se ao número de aortas avaliadas.

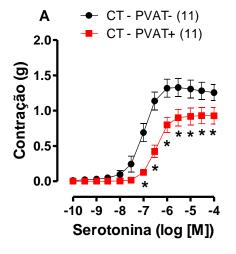
Tabela 8 – Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de aorta torácica à noradrenalina

	Rmax (g)	Log EC50
CT – PVAT- (14)	1,01 ± 0,17	-8,24 ± 0,21
CT – PVAT+ (16)	$0,62 \pm 0,10*$	$-7,48 \pm 0,11$
OB – PVAT- (10)	0.74 ± 0.11	$-7,95 \pm 0,19$
OB – PVAT+ (9)	0.38 ± 0.09 *	-7,11 ± 0,16

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivo anel sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número entre parênteses refere-se ao número de aortas avaliadas.

5.3.2 Modulação da resposta vasoconstritora à serotonina pelo PVAT

Para avaliar se o efeito anticontrátil do PVAT marrom de camundongos obesos era mantido para outros agonistas, curvas concentração-resposta para serotonina foram avaliadas. A presença do PVAT reduziu a resposta à serotonina tanto no grupo controle quanto no grupo obeso (Figura 10A e 10B, Tabela 9).



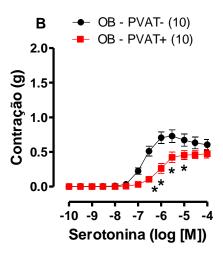


Figura 10 - Curvas concentração-resposta para serotonina em anéis de aorta torácica com (PVAT+) e sem (PVAT-) PVAT de camundongos controles (CT) e obesos (OB). * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, duas vias). O número entre parênteses refere-se ao número de aortas avaliadas.

Tabela 9 – Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (log EC50) dos anéis de aorta torácica à serotonina

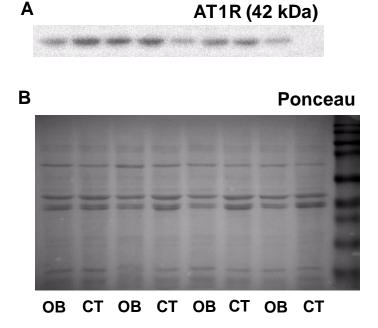
	Rmax	EC50
CT – PVAT- (11)	1,31 ± 0,13	$-7,04 \pm 0,06$
CT – PVAT+ (11)	0.93 ± 0.12 *	$-6,43 \pm 0,06$
OB – PVAT- (10)	0.71 ± 0.10	$-6,84 \pm 0,03$
OB – PVAT+ (10)	$0,49 \pm 0,07*$	$-5,94 \pm 0,13$

CT: controle. OB: obeso. PVAT-: anéis sem PVAT. PVAT+: anéis com PVAT. Valores estão expressos como média ± epm. * p < 0,05 versus respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) (ANOVA, uma via). O número entre parênteses refere-se ao número de aortas avaliadas.

5.4 Conteúdo proteico dos receptores de Ang II e eNOS

5.4.1 Conteúdo proteico do receptor AT1 em artérias mesentéricas

Não observamos diferenças no conteúdo proteico do receptor AT1 em artérias mesentéricas entre os grupos controle e obeso (Figura 11A e 11C).



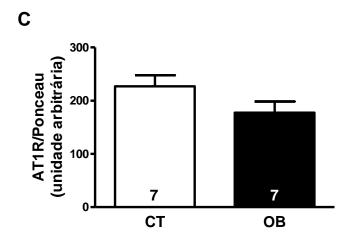


Figura 11 – Conteúdo proteico do receptor AT1 em artérias mesentéricas de camundongos controles (CT) e obesos (OB). Imagens representativas do *imunoblotting* para AT1 (A) e da respectiva membrana corada com Ponceau (B). Densidade óptica das bandas de AT1 normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau das respectivas amostras (C). As barras representam média ± epm. O número de animais avaliados encontra-se no interior das barras.

5.4.2 Conteúdo proteico do receptor AT2 em artérias mesentéricas

Não observamos diferenças no conteúdo proteico do receptor AT2 em artérias mesentéricas entre os grupos controle e obeso (Figura 12A e 12C).

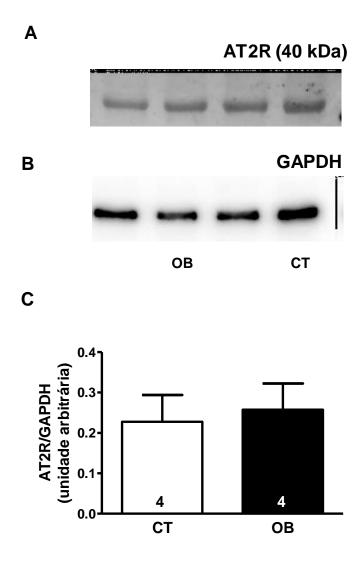


Figura 12 – Conteúdo proteico do receptor AT2 em artérias mesentéricas de camundongos controles (CT) e obesos (OB). Imagens representativas do *imunoblotting* para AT2 (A) e GAPDH (B). Densidade óptica das bandas de AT2 normalizada pela densidade óptica das bandas de GAPDH das respectivas amostras (C). As barras representam média ± epm. O número de animais avaliados encontra-se no interior das barras.

5.4.3 Conteúdo proteico da enzima eNOS em artérias mesentéricas

Houve um aumento do conteúdo proteico da enzima eNOS em artérias mesentéricas no grupo obeso em relação ao grupo controle (Figuras 13A e 13C). Não houve diferença no conteúdo proteico da eNOS entre os grupos tratados com losartana (Figuras 13A e 13C).

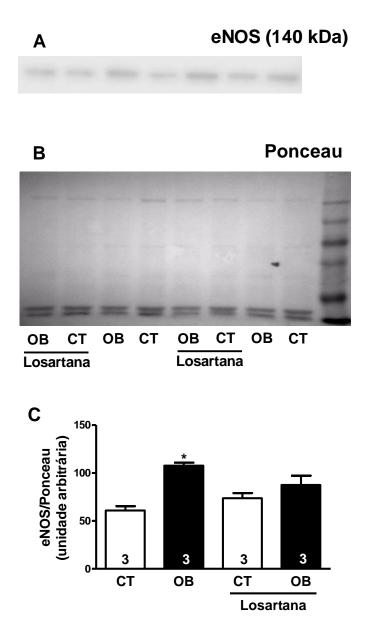


Figura 13 – Conteúdo proteico da enzima eNOS em artérias mesentéricas de camundongos controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não com losartana. Imagens representativas do *imunoblotting* para eNOS (A) e da respectiva membrana corada com Ponceau (B). Densidade óptica das bandas de eNOS normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau das respectivas amostras (C). As barras representam média ± epm. *p < 0,05 versus CT (ANOVA-uma via). O número de animais avaliados encontra-se no interior das barras.

5.4.4 Conteúdo proteico da enzima eNOS em PVAT de artérias mesentéricas

Houve uma diminuição do conteúdo proteico da enzima eNOS no PVAT de artérias mesentéricas no grupo obeso em relação ao grupo controle (Figuras 14A e 14C). O tratamento com losartana aumentou o conteúdo proteico da eNOS nos grupos controle e obeso, mas esse conteúdo ainda foi menor no grupo obeso (Figuras 14A e 14C).

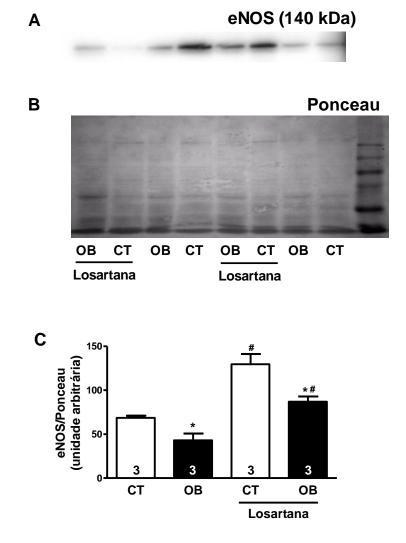


Figura 14 – Conteúdo proteico da enzima eNOS no PVAT de artérias mesentéricas de camundongos controles (CT) e obesos (OB) tratados ou não com losartana. Imagens representativas do *imunoblotting* para eNOS (A) e da respectiva membrana corada com Ponceau (B). Densidade óptica das bandas de eNOS normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau das respectivas amostras (C). As barras representam média ± epm. *p < 0,05 versus CT e CT+Losartana e * p < 0,05 versus CT e OB (ANOVA-uma via). O número de animais avaliados encontra-se no interior das barras.

6 DISCUSSÃO

Para estudar a obesidade, diversos estudos optam pela indução da obesidade por dieta hiperlipídica, uma vez que essa dieta promove aumento da massa corpórea, além de induzir inflamação do tecido adiposo visceral, podendo contribuir para o desenvolvimento da resistência à insulina, diabetes e dislipidemia (Gil-Ortega et al., 2010).

De Souza e colaboradores (2005) demonstraram que, em camundongos machos Swiss de 4 semanas de idade, o tratamento com dieta hiperlipídica promoveu aumento do ganho de massa corpórea e dos níveis séricos de glicose e insulina a partir da 8ª semana do início da dieta. Já ao avaliar o efeito da dieta em camundongos CBA machos com a mesma idade, o grupo mostrou que os animais tornaram-se obesos e hiperinsulinêmicos após 8 semanas de dieta, porém não estavam diabéticos, mesmo após 16 semanas de dieta (De Souza et al., 2005). Esses resultados mostram que, como em humanos, as linhagens de camundongos dependem da associação de fatores ambientais com fatores genéticos para desenvolverem obesidade e diabetes.

Em nosso estudo, a ingestão da dieta hiperlipídica aumentou o ganho de massa corpórea a partir da 3ª semana de dieta de camundongos C57BL/6 em relação aos camundongos que receberam dieta padrão. Além disso, camundongos que receberam ração hiperlipídica apresentaram maior índice de Lee, massa dos depósitos de gordura retroperitoneal e periepididimal e níveis glicêmicos em relação aos camundongos que receberam ração padrão, demonstrando então que a dieta hiperlipídica foi eficaz em induzir obesidade e alteração da homeostasia glicêmica também na linhagem C57BL/6. A dieta hiperlipídica também reduziu а massa do músculo gastrocnêmio, demonstrando que houve perda de massa magra com a indução da obesidade.

Os adipócitos provem de células-tronco mesenquimais multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo. Essas células multipotentes tornam-se pré-adipócitos quando perdem a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais e tornam-se comprometidas com a linhagem adipocitária (Queiroz et al., 2009). Dessa forma, o tecido adiposo pode sofrer expansão por um aumento no número de pré-adipócitos (hiperplasia) ou por

um aumento no armazenamento de lipídeos no interior de adipócitos já existentes (hipertrofia) (Frigolet et al., 2013).

Como dito anteriormente, há um SRAA local no tecido adiposo que participa de diversos processos, inclusive no aumento do tecido adiposo. Por exemplo, a Ang II está envolvida no crescimento dos adipócitos, na modulação da adipogênese e no metabolismo lipídico, resultando consequentemente no aumento do tamanho do adipócito (Frigolet et al., 2013; Jones et al., 1997).

Janke e colaboradores (2002) demonstraram in vitro que, ao incubar préadipócitos isolados de tecido adiposo subcutâneo de humanos com Ang II houve uma inibição da diferenciação adipogênica e o bloqueio do receptor AT1 com o antagonista irbesartan, mas não do receptor AT2 com o antagonista PD 123,319, promoveu aumento do acúmulo lipídico e da diferenciação dos adipócitos. Por outro lado, ratos Sprague-Dawley que foram tratados com losartana (15 mg/kg durante duas semanas) apresentaram uma diminuição na massa do tecido adiposo e no tamanho do adipócito (Crandall et al., 1994). Em nosso estudo, o tratamento com o antagonista do receptor AT1 losartana (10 mg/kg) não modificou o ganho de massa corpórea e aumento dos depósitos de gordura em nenhum dos grupos, indicando que o tempo de tratamento e a dose proposta não foram suficientes para mostrar o envolvimento da Ang II com o aumento da massa de nenhum dos depósitos de tecido adiposo avaliados em nosso modelo experimental. Ainda, a disparidade dos resultados pode indicar também que o papel da Ang II sobre a adipogênese e diferenciação dos adipócitos depende da espécie estudada.

Dois tipos de tecido adiposo existem no organismo: o tecido adiposo marrom, que atua principalmente na manutenção da temperatura corpórea; e o tecido adiposo branco, que está distribuído em tecido adiposo visceral e subcutâneo e é mais propenso à inflamação (lkeoka et al., 2010). O tecido adiposo possui funções endócrinas, pois secreta várias adipocinas que afetam diretamente o metabolismo energético, a sensibilidade à insulina, a resposta inflamatória e a função vascular (Fernández-Alfonso et al., 2013).

Assim como os outros depósitos de tecido adiposo, o PVAT também pode ser classificado como marrom e branco, dependendo do leito vascular em que está localizado. Por circundar a maioria dos vasos sanguíneos, e por não haver nenhuma barreira entre o vaso e o tecido adiposo, o PVAT age de forma

parácrina na vasculatura, regulando a reatividade vascular (Rajsheker et al., 2011).

Antigamente, o PVAT era removido na maioria dos estudos da função vascular por acreditarem que o PVAT seria apenas um tecido de suporte (Dubrovska et al., 2004). Entretanto, o PVAT secreta diversos fatores que podem influenciar a reatividade vascular. Dentre as adipocinas que o PVAT libera estão o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), IL-1, IL-6, TNF-α, leptina, adiponectina, angiotensinogênio, EROs, entre muitas outras substâncias que possuem propriedades vasoconstritoras e vasodilatadoras (Gollasch, 2012).

Soltis e Cassis (1991) observaram que em anéis de aorta torácica de ratos, a presença do PVAT reduzia a resposta vasoconstritora à noradrenalina. A maioria dos estudos de reatividade vascular utiliza o segmento torácico da aorta, onde o PVAT é marrom. Em nosso estudo, utilizando além da aorta torácica, artérias mesentéricas, onde o PVAT é branco, observamos que a redução da resposta vasoconstritora à noradrenalina na presença do PVAT ocorreu nos dois leitos vasculares, demonstrando um efeito anticontrátil promovido pelo PVAT marrom e branco.

A obesidade promove aumento da massa do tecido adiposo em seus diferentes depósitos, inclusive no PVAT (Vázquez-Vela et al., 2008). Em nosso estudo, somente os anéis com PVAT da aorta torácica de camundongos obesos estavam aumentados em relação aos dos animais controles. Contudo, além da expansão do tecido adiposo, há uma disfunção dos adipócitos na obesidade, caracterizada por uma secreção anormal de adipocinas, onde há aumento da secreção de adipocinas pró-aterogênicas, pró-inflamatórias e pródiabéticas que estão acompanhadas pela diminuição na produção de adiponectina (Hajer et al., 2008).

Como dito anteriormente, já foi demonstrado que o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT é perdido na obesidade (Gao et al., 2005; Voorde et al., 2014). No presente estudo, a massa dos anéis com PVAT de artérias mesentéricas de camundongos obesos foi semelhante ao de camundongos controles, mas a presença do PVAT em anéis de artérias mesentéricas não reduziu a resposta vasoconstritora, mostrando que o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco foi perdido com a obesidade. Entretanto, a

presença do PVAT em anéis de aorta torácica reduziu a resposta vasoconstritora, demonstrando que o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT marrom é preservado na obesidade.

Fésüs e colaboradores (2007) demonstraram que, em ratos Sprague-Dawley, o PVAT atenuou a resposta à noradrenalina e também reduziu a resposta a outros vasoconstritores como a serotonina, fenilefrina e Ang II em anéis de aorta torácica e artérias mesentéricas. De acordo com esses dados, no presente estudo, a fim de avaliar se a ação anticontrátil do PVAT marrom de camundongos obesos era mantida para outros agonistas, foram realizadas curvas concentração-resposta para serotonina em anéis de aorta torácica, com e sem PVAT. A resposta vasoconstritora à serotonina, na presença do PVAT, foi reduzida em relação aos anéis sem PVAT, tanto no grupo controle, quanto no grupo obeso, reforçando que o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT marrom continua íntegro na obesidade.

O fato de que o PVAT marrom e o PVAT branco são histologicamente distintos e secretam um conjunto diferente de adipocinas (Bloor, Symonds, 2014), poderia explicar a diferença do efeito da obesidade sobre a ação anticontrátil do PVAT marrom e branco em nosso estudo.

Police e colaboradores (2009) descreveram que, em camundongos obesos induzidos por dieta, a infiltração de macrófagos no PVAT branco era maior em comparação ao PVAT marrom, indicando que o PVAT branco parece ser mais propenso à inflamação. Fitzgibbons e colaboradores (2014) também demonstraram que o PVAT marrom de camundongos obesos induzidos por dieta apresentou maior resistência à infiltração de macrófagos. Sendo assim, a diferença entre os dois PVATs, tanto em relação às adipocinas liberadas quanto à propensão à inflamação, pode explicar porque a ação anticontrátil do PVAT branco é perdida na obesidade, mas essa ação do PVAT marrom é preservada.

Sabe-se que os adipócitos expressam todos os componentes do SRAA e o bloqueio com antagonistas do receptor AT1 de Ang II exerce efeitos benéficos na sobrevivência, elevação da pressão sanguínea e risco cardiovascular em animais obesos (Cat et al., 2011).

Nosso grupo mostrou que a obesidade modula o conteúdo de RNAm dos componentes do SRAA de forma diferente no PVAT da aorta torácica e

artérias mesentéricas em camundongos (Inada et al., 2014). Além disso, demonstramos que a atividade da ECA está reduzida no PVAT marrom da aorta torácica, mas essa atividade não foi modificada no PVAT branco do leito mesentérico (Inada, 2016). Dessa forma, no presente estudo, a fim de avaliar a participação do SRAA no efeito da obesidade sobre a ação anticontrátil do PVAT branco, camundongos controles e obesos foram tratados com losartana (10 mg/kg) durante 30 dias na água de beber.

Em artérias mesentéricas, o bloqueio crônico do receptor AT1 foi capaz de resgatar o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco que foi abolido pela obesidade, já que a presença do PVAT reduziu a resposta vasoconstritora à noradrenalina em camundongos obesos tratados com losartana, sugerindo que a Ang II está envolvida no processo de perda do efeito anticontrátil do PVAT branco promovida pela obesidade.

Para avaliar se a participação da Ang II na perda da ação anticontrátil do PVAT se dá de maneira direta, incubamos os anéis com antagonista do receptor AT1 losartana no momento da avaliação da reatividade vascular nos grupos controle e obeso. Pudemos observar que o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco ainda foi demonstrado no grupo controle, já que a presença do PVAT reduziu a resposta vasoconstritora à noradrenalina. Entretanto, no grupo obeso, mesmo na presença de losartana, a resposta vasoconstritora à noradrenalina foi semelhante nos anéis com e sem PVAT, demonstrando que a recuperação do efeito anticontrátil requer inibição crônica das ações da Ang II e que, pelo menos parte das ações da Ang II no PVAT depende de mecanismos indiretos. Por outro lado, Rosei e colaboradores (2015) demonstraram que, em ratos Sprague-Dawley com obesidade induzida por dieta, inibição aguda da ECA foi capaz de recuperar o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco em artérias mesentéricas.

Em diversas doenças cardiovasculares, a Ang II induz uma resposta vasoconstritora e pró-inflamatória, por aumentar a geração de EROs, o que leva à redução da disponibilidade de NO e ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (Montezano et al., 2014). Sabe-se que a Ang II ativa a NADPH oxidase em células endoteliais e do músculo liso, resultando na geração de EROs, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, que

estão envolvidos nos efeitos vasculares induzidos pela Ang II (Garrido, Griendling, 2009).

Para avaliar a participação da enzima NAPDPH oxidase na perda da ação anticontrátil do PVAT branco promovida pela obesidade, utilizamos a apocinina, um inibidor dessa enzima. E, uma vez que a resposta vasoconstritora à noradrenalina foi semelhante nos anéis com e sem PVAT do grupo obeso, as EROs da NADPH oxidase parecem não participar da perda da ação anticontrátil do PVAT branco.

Fomos, então, avaliar os mecanismos pelos quais o tratamento crônico com losartana recupera a ação anticontrátil do PVAT no grupo obeso. Os efeitos da Ang II são regulados através do equilíbrio entre a expressão dos receptores AT1 e AT2. O receptor AT1 é responsável pelos efeitos deletérios conhecidos da Ang II, como a vasoconstrição, secreção de aldosterona, inflamação, hipertrofia e fibrose, enquanto o receptor AT2 quando ativado medeia efeitos em direções opostas, promovendo vasodilatação, ações antiinflamatórias e anti-fibróticas, inibição do crescimento celular e geração de NO (Cat, Touyz, 2011; Cat et al., 2013). Assim, incubamos anéis de artérias mesentéricas dos grupos controle e obeso tratados com losartana, com o antagonista do receptor AT2 PD 123,319 e observamos que o receptor AT2 parece mediar a recuperação do efeito anticontrátil no grupo obeso, uma vez que o bloqueio desse receptor não só aboliu a recuperação da ação anticontrátil do PVAT promovida pelo tratamento com losartana, mas fez com que a resposta vasoconstritora à noradrenalina fosse aumentada na presença do PVAT.

Hagihara e colaboradores (2014) demonstraram que em ratos obesos induzidos por glutamato monossódico houve um aumento na expressão do receptor AT2 em artérias mesentéricas, mas sem diferenças na expressão do receptor AT1. Em nosso estudo, não observamos diferenças significativas na expressão do conteúdo proteico dos receptores AT1 e AT2 em artérias mesentéricas entre os grupos controle e obeso. Contudo, um estudo do nosso grupo mostrou que, diferentemente das artérias mesentéricas, a expressão do receptor AT1, assim como do AT2, estão aumentadas no PVAT branco do leito mesentérico de camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica (Inada, 2016).

O bloqueio do receptor AT1 leva a um mecanismo compensatório, onde o receptor AT2 é mais ativado, levando a um aumento de NO, que resulta em um efeito vasodilatador, auxiliando na manutenção da resistência vascular (Fernández-Alfonso et al., 2013).

Diferentemente dos receptores AT1, os receptores AT2 não são internalizados durante a ligação com a Ang II. Três vias de sinalização principais foram descritas a partir da ativação da proteína G: 1) estimulação de proteínas fosfatases causando uma desfosforilação proteica; 2) ativação da via do NO/GMPc; e 3) estimulação da fosfolipase A e liberação de ácido araquidônico (Lemarié, Schiffrin, 2010). A segunda via de sinalização envolve a ativação da eNOS, resultando na liberação de NO e, consequentemente, vasodilatação (Sun et al., 2013).

Gao e colaboradores mostraram que a ação do fator relaxante derivado do PVAT marrom era dependente do endotélio (Gao et al., 2006) e de NO (Gao et al., 2007), pois, em anéis de aorta de ratos Wistar saudáveis com PVAT intacto, a presença de L-NAME atenuou a ação anticontrátil.

Em nosso estudo, incubamos anéis de artérias mesentéricas com L-NAME, a fim de avaliar se a recuperação do efeito anticontrátil do PVAT com o tratamento com losartana no grupo obeso era dependente de NO. No grupo controle, a presença de L-NAME não aboliu o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT, demonstrando que esse efeito em camundongos não depende, pelo menos exclusivamente, de NO. No grupo obeso, na presença de L-NAME, a resposta à noradrenalina foi semelhante em anéis com e sem PVAT. Já nos grupos tratados com losartana, na presença de L-NAME, a resposta vasoconstritora à noradrenalina foi aumentada em anéis com PVAT em comparação aos anéis sem PVAT de camundongos controles e semelhante entre anéis com e sem PVAT de camundongos obesos, sugerindo que o bloqueio crônico do receptor AT1 aumenta a participação do NO na ação anticontrátil do PVAT tanto de camundongos controles, quanto de camundongos obesos.

Sabe-se que a eNOS está envolvida nas ações do PVAT em relação ao controle do tônus vascular, uma vez que já foi descrito que o PVAT pode ser uma fonte de NO adicional no camundongo obeso induzido por dieta hiperlipídica (Gil-Ortega et al., 2010).

Vimos que a expressão da eNOS em artérias mesentéricas de camundongos obesos estava aumentada em relação ao grupo controle. Contudo, o conteúdo proteico de eNOS no PVAT de camundongos obesos estava reduzido, o que poderia explicar a perda da ação anticontrátil do PVAT no grupo obeso. O tratamento com losartana não modificou o conteúdo proteico da eNOS em artérias mesentéricas do grupo controle, mas reduziu o conteúdo proteico dessa enzima em artérias mesentéricas do grupo obeso. Por outro lado, o bloqueio crônico do receptor AT1 aumentou o conteúdo proteico da eNOS no PVAT tanto do grupo controle, quanto do grupo obeso.

Em 2013, Sun e colaboradores desenvolveram um estudo a fim de demonstrar que os níveis elevados de ácidos graxos livres poderiam atenuar a resposta anticontrátil promovida pelo PVAT marrom. Esses autores mostraram que, em anéis de aorta torácica de ratos obesos induzidos por dieta, um doador de NO (MAHMA NONOato) recuperou parcialmente o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT, indicando a importância do NO nesse efeito. Portanto, esses resultados indicam que, a integridade tanto do endotélio quanto do PVAT é importante para a manutenção do tônus vascular.

Nossos resultados indicam a participação do receptor AT2 no efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco na vigência do bloqueio crônico do receptor AT1, cuja ativação promove geração de NO e, consequentemente, redução da contração.

7 CONCLUSÃO

Diante desses dados, podemos concluir que a obesidade induz disfunção do PVAT branco, mas não do PVAT marrom, e que o SRAA pode estar envolvido. O efeito anticontrátil promovido pelo PVAT branco pode ser recuperado pelo tratamento crônico com losartana, por meio de mecanismo dependente de AT2 e NO.

REFERÊNCIAS*

Ahima RS. Digging deeper into obesity. J Clin Invest. 2011; 121 (6): 2076-9.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, "ABESO". Mapa da obesidade. Disponível em: http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade. Acesso em: 28 jul. 2015.

Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. Cellular Signalling. 2014; 26: 2147-60.

Bloor ID, Symonds ME. Sexual dimorphism in white and brown adipose tissue with obesity and inflammation. Horm Behav. 2014; 66 (1): 95-103.

Britton KA, Fox CS. Perivascular adipose tissue and vascular disease. Clin Lipidol. 2011; 6: 79-91.

Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, Chen YE, Chang L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014; 34: 1621-30.

Caballero B. The Global Epidemic of Obesity: An Overview. Epidemiologic Reviews. 2007; 29: 1-5.

Cannon B, Nedergaard J. Yes, even human brown fat is on fire! J Clin Invest. 2012; 122: 486-9.

Cat AND, Briones AM, Callera GE, Yogi A, He Y, Montezano AC, Touyz RM. Adipocite-derived factors regulate vascular smooth muscle cells through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. Hypertension. 2011; 58: 479-88.

Cat AND, Touyz RM. A new look at the renin-angiotesin system – focusing on the vascular system. Peptides. 2011; 32: 2141-50.

Cat AND, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase and redox signaling in the vasculature. Antioxidants & Redox Signaling. 2013; 19: 1110-9.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform requirements.html.

Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, Rothenberg FG, Neltner B, Romig-Martin SA, Dickson EW, Rudich S, Weintraub NL. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes influence of high-fat feeding. Circ Res. 2009; 104: 541-9.

Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD, Kral JG. Developmental aspects of the adipose tissue renin-angiotensin system: therapeutic implications. Drug Dev Res. 1994; 32: 117–25.

De Souza CT, Araújo EP, Prada PO, Saad MJA, Velloso LA. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. Diabetologia. 2005; 48: 1860-71.

Dubrovska G, Verlohren S, Luft FC, Gollasch M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 286: 1107-13.

Eringa EC, Bakker W, Hinsbergh VWM. Paracrine regulation of vascular tone, inflammation and insulin sensitivity by perivascular adipose tissue. Vascular Pharmacology. 2012; 56: 204-9.

Fernandez-Alfonso MS, Gil-Ortega M, García-Prieto CF, Aranguez I, Ruiz-Gayo M, Somoza B. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. Int Int J Endocrin. 2013; 2013: 1-8.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Science. 2011; 12: 3117-32.

Fésüs G, Dubrovska G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilatador. Cardiovascular Research. 2007; 75: 719-27.

Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinic associations. J Am Heart Assoc. 2014; 3: 1-15.

Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM. Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity. Science. 1987; 237: 405-8.

Flores-Muñoz M, Smith N, Haggerty C, Milligan G, Nicklin S. Angiotensin 1–9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. J Physiol. 2011; 589: 939–51.

Fonseca MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do mestabolismo. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006; 50 (2): 216-29.

Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Mergs JB, Cupples A, D'Agostino RB, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart study. Circulation. 2007; 116: 39-48.

Frigolet ME, Torres N, Tovar AR. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. J Nutri Biochem. 2013; 24: 2003-15.

Gálvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stuchi P, de las Heras Al, Merino B, Arribas S, Ruiz-Gayo M, Huber M, Wehland M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system componentes between white and brown perivascular adipose tissue. Journal of Endocrinology. 2008; 197: 55-64.

Galvez-Prieto B, Somoza B, Gil-Ortega M, García-Prieto CF, de Las Heras Al, González MC, Arribas S, Aranquez I, Bolbrinker J, Kreutz R, Ruiz-Gayo M, Fernández-Alfonso MS. Anticontractile effect of perivascular adipose tissue and leptin are reduced in hypertension. Front Pharmacol. 2012; 3 (103): 1–8.

Gao YJ, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrikk JJ, Foster WG, Lee RM. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. Obesity Research. 2005; 13 (4): 687–92.

Gao YJ, Lu C, Sharma AM, Lee RMKW. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. British Journal of Pharmacology. 2007; 151: 323-31.

Gao YJ. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and it potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular disfunction. Curr Pharm Des. 2007; 13: 2185-92.

Gao YJ, Takemori K, Su LY, An WS, Lu C, Sharma AM, Lee RMKW. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. Cardiovasc Res. 2006; 71: 363-73.

Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. Mol Cell Endocrinol. 2009; 302: 148–58.

Gil-Ortega M, Stucchi P, Guzmán-Ruiz R, Cano V, Arribas S, González MC, Ruiz-Gayo M, Fernández-Alfonso MS, Somoza B. Adaptative nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. Endocrinology. 2010; 151 (7): 3299-306.

Gollasch M. Vasodilatador signals from perivascular tissue. British Journal of Pharmacology. 2012; 165: 633-42.

Haberka M, Gasior Z. Carotid extra-media thickness in obesity and metabolic syndrome: A novel index of perivascular adipose tissue, extra-media thickness in obesity and metabolic syndrome. Atherosclerosis. 2015; 239: 169-77.

Hagihara GN, Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, Aragão DS, Casarini DE, Carvalho MHC, Fortes ZB. Upregulation of ERK1/2-eNOS via AT2 receptors decreases the contractile response to angiotensin II in resistance mesenteric arteries from obese rats. PLoS ONE. 2014; 9 (8): e106029.

Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. European Heart Journal. 2008; 29: 2959-71.

Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and patophisiology. Clin Sci (Lond). 2007; 112: 417-28.

Houben AJ, Eringa EC, Jonk AM, Serne EH, Smulders YM, Stehouwer CD. Perivascular Fat and the Microcirculation: Relevance to Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease. Curr Cardiovasc Risk Rep. 2011; 6: 80-90.

Houriuchi M, Lehtonen JY, Daviet L. Signaling mechanism of the AT2 angiotensin II receptor: crosstalk between AT1 and AT2 receptors in cell growth. Trend Endocrinol Metab. 1999; 10: 391-6.

Huang F, Lezama MAR, Ontiveros JAP, Bravo G, Villafaña S, del-Rio-Navarro BE, Hong E. Effect of Losartan on Vascular Function in Frutose-Fed Rats: The Role of Perivascular Adipose Tissue. Clinical and Experimental Hypertension. 2008; 32: 98-104.

Ikeoka D, Mader JK, Pieber TR. Adipose tissue, inflammation and cardiovascular disease. Rev Assoc Med Bras. 2010; 56: 116-21.

Inada AC, Silva RNO, Eichler RS, Carvalho MHC, Akamine EH. Efeito da obesidade sobre a expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona no tecido adiposo perivascular: diferença entre o tecido adiposo branco e marrom. FeSBE, 2014.

Inada AC. Componentes do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo perivascular da aorta torácica e do leito mesentérico: alterações promovidas pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2016.

Ishibashi J, Seale P. Beige can be slimming. Science. 2010; 328 (5982): 1113-4.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Mature adipocytes in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. Diabetes. 2002; 51: 1699-707.

Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. Endocrinology. 1997; 138: 1512-9.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endrocrine organ. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2004; 89: 2548-56.

Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. Circulation Journal. 2010; 74: 1479-87.

Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. Frontiers in Endocrinology. 2013; 4: 1-13.

Leal VO, Mafra D. Adipokines in obesity. Chinica Chimica Acta. 2013; 419: 87-94.

Lee MHH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC. Perivascular adipose tissue inhibits endothelial function of rat aortas via caveolin-1. PLoS ONE. 2014; 9: 1-10.

Lemarié CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type receptor in cardiovascular disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2010; 11: 19-31.

Maenhaut N, Van De Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. BMC Med. 2011; 16: 9-25.

Martinez LL, Oliveira MA, Miguel AS, Rastelli VMF, Cruz JWMC, Tostes RCA, Carvalho MHC, Nigro D, Fortes ZB. Losartan attenuates the antimigratory effect of diclofenac in spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2005; 46: 190-9.

Meijer RI, Serne EH, Smulders YM, Hinsbergh VWM, Yudkin JS, Eringa EC. Curr Diab Rep. 2011; 11: 211-7.

Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. British Journal of Pharmacology. 2012; 165: 643-58.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res. 1977; 41: 19-26.

Okada S, Kozuka C, Masuzaki H, Yasue S, Ishii-Yonemoto T, Tanaka T, Yamamoto Y, Noguchi M, Kusakabe T, Tomita T, Fujukura J, Ebihara K, Hosoda K, Sakaue H, Kobori H, Ham M., Lee YS, Kim JB, Saito Y, Nakao K. Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. Elsevier. 2010; 59: 1241-51.

Organização Mundial de Saúde. "WHO – World Health Organization. Obesity and Overweight". Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/. Acesso em: 09 fev. 2015.

Organização Mundial de Saúde. "WHO-World Health Organization. Body mass index (BMI) classification". Disponível em: http://www.who.int/topics/obesity/en/. Acesso em: 09 fev. 2015.

Oriowo MA. Perivascular adipose tissue, vascular reactivity and hypertension. Med Princ Pract. 2014; 24: 29-37.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nature Reviews. 2011; 11: 85-97.

Payne GA, Kohr MC, Tune JD. Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease. British Journal of Pharmacology. 2011; 165: 659-69.

Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of the renin-angotensin systems. Physiological Reviews. 2006; 86: 747–803.

Police SB, Thatcher SE, Charnigo R, Daughtery A, Cassis LA. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin Il-induced abdominal aortic aneurysm. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009; 29: 1458-64.

Queiroz JCF, Alonso-Vale MIC, Curi R, Lima FB. Controle da adipogênese por ácidos graxos. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009; 53 (5): 582-94.

Rajsheker S, Manka D, Blomkains AL, Chaterjee TK, Stoll LL, Weintraub NL. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. Curr Opin Pharmacol. 2011; 10: 191-6.

Romero-Calvo I, Ócon B, Martínez-Moya P, Súarez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. Analytical Biochemistry. 2010; 401: 318-20.

Rosei CA, Withers SB, Belcaid L, De Ciuceis C, Rizzoni D, Heagerty AM. Blockade of the renin-angiotensin system in small arteries and anticontractile function of perivascular adipose tissue. Journal of Hypertension. 2015; 33: 1039-45.

Seale P, Kajimura S, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function – of mice and men. Genes Dev. 2009; 23 (7): 788-97.

Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, "SBEM". O que é a obesidade? Disponível em: http://www.endocrino.org.br/o-que-e-obesidade. Acesso em: 01 jun. 2016.

Soltis E, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. Clin Exp Hypertens. 1991; 13: 277-96.

Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, Frisbee JC. Obesity and vascular dysfunction. Pathophysiology. 2008; 15: 79-89.

Sun X, Hou N, Han F, Guo Y, Hui Z, Du G, Zhang Y. Effect of high free fatty acids on the anti-contractile response of perivascular adipose tissue in rat aorta. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2013; 63: 169-74.

Szasz T, Bomfim GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. Vascular Health and Risk Management. 2013; 9: 105-16.

Thalmann S, Meier CA. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. Cardiovascular Research. 2007; 75: 690-701.

Vázquez-Vela FME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as an endocrine organ and its role in obesity. Elsevier. 2008; 39: 715-28.

Voorde JV, Boydens C, Pauwels B, Decaluwé K. Perivascular adipose tissue, inflammation and vascular dysfunction in obesity. Current Vascular Pharmacology. 2014; 12: 403-11.

Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite", and white adipose tissues. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012; 302: 19-31.

Wang Y, Jacobs EJ, Patel AV, Rodríguez Z, McCullough ML, Thun MJ, Calle EE. A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence. Cancer Cause Control. 2008; 19 (7): 783-92.

Yiannikouris F, Gupte M, Putnam K, Thatcher S, Charnigo R, Rateri DL, Daughtery A, Cassis LA. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. Hypertension. 2012; 60: 1524-30.