ANTONIO GARCIA SOARES JÚNIOR

**OBESIDADE INDUZ ALTERAÇÕES ARTÉRIAS-ESPECÍFICA:
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS
MUSCULARES LISAS**

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.

São Paulo
2014

ANTONIO GARCIA SOARES JÚNIOR

**OBESIDADE INDUZ ALTERAÇÕES ARTÉRIAS-ESPECÍFICA:
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS
MUSCULARES LISAS**

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: Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Soares Júnior, Antonio Garcia.

Obesidade induz alterações artéria-específica: avaliação da função endotelial e do fenótipo das células musculares lisas / Antonio Garcia Soares Júnior. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine.

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

Versão do título para o inglês: Obesity leads to artery-specific alterations: evaluation of the endothelial function and smooth muscle cell phenotype.

1. Endotélio vascular 2. Obesidade 3. Óxido nítrico 4. Músculo liso vascular I. Akamine, Profa. Dra Eliana Hiromi II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0153/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Antonio Garcia Soares Soares Júnior.

Título da Dissertação: Obesidade induz alterações artéria-específica: avaliação da função endotelial e do fenótipo das células musculares lisas.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 -e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
---	---

Decl. CEUA.031/2012.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 195/11/CEUA, datado de 08.12.11 e por solicitação da Profa. Dra. **Elana Hiromi Akamine**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Antônio Garcia Soares Junior** ao Projeto de Pesquisa "*Obesidade senescência celular e disfunção endotelial: efeito da desidroepiandrosterona*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 10 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Vice- Coordenador da CEUA
ICB/USP

Aos meus pais Antônio e Ironilda, por todo o apoio e dedicação.

Aos meus irmãos Sara (*in memoriam*), Sandra e Aníbal.

À Jaqueline Jamara, minha fiel escudeira, sempre me apoiando e incentivando para buscar sempre o melhor.

Muitíssimo obrigado por fazerem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo o que tem me proporcionado o caminho ideal, e ainda mais a me dar forças para trilhar sem pestanejar.

Às professoras Dra. Zuleica Bruno Fortes, Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho e Dra. Eliana Hiromi Akamine por acreditarem e apoiarem o meu desenvolvimento profissional. Sou muito grato pela oportunidade que recebi.

À professora Jane, quem me apoiou desde o início lá em 2001.

Ao professor Dr. Anselmo Sigari Moriscot, tenho muito a agradecer pela oportunidade durante o estágio técnico. Agradeço sempre por ter a oportunidade de trabalho e pela amizade.

À professora Dra. Cecília Gouveia, sou muito grato pelas horas de ensino e dedicação.

À Dra. Lúcia “Malla”, pelo incentivo constante e as conversas regadas a café de fim de tarde.

Aos professores Dra. Elen Miyabara, Dr. Marcelo Saldanha pelos momentos de inspiração durante meu início de jornada.

Aos professores Dra. Soraia Katia Pereira Costa e Dr. Marcelo Nicolás Muscará por me receberem de braços abertos no laboratório nesta nova etapa da minha carreira.

Aos grandes amigos de ICB: Cida (Conheeeeeeece) – obrigado pelo auxílio em todos os momentos ! Rosângela “My Friéndy”, quer dizer na verdade não... Martinha, Sônia Bá, Ritinha, Tia Irene, Simone, Alicezinha, Julieta, Selminha, Manecas (“e a porcada ?”), Manuel, Magal (Sidney), Adilson e muitos outros, deixo aqui o meu agradecimento.

Aos colegas da Biblioteca do ICB, sempre zelosos e prestativos.

Aos alunos do Departamento de Farmacologia: Carolzitcha, Aline Japa, Rennezita, Cinthya Neném, Bia, Vanessa, Verônica, Fer, Anninha (“não é parecida com o Samaras”), Mano Tiago, Ágatha “Utah”, Leandroviski, Silvia – Mira Mira, Tuanny, Flávinha, Flávia, Amaral, Ju, Philiphe, Dras. Simone do Pai e Karen Baranga e a muitos outros, pois só rindo mesmo para sermos mais felizes.

Às secretarias do departamento de Farmacologia, Camila, Mirian e Mônica, ajudando sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto.

Obrigado a todos os que de alguma forma me auxiliaram nessa jornada.

"Do or do not. There is no try !"
Master Yoda

RESUMO

Soares AG. Obesidade induz alterações artéria-específica: avaliação da função endotelial e do fenótipo das células musculares lisas. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A obesidade pode mudar as características das células endoteliais e musculares lisas (CMLVs). Reatividade e genes inflamatórios e de marcadores de fenótipo de CMLVs foram avaliados em artérias mesentéricas de resistência (AMRs) e de aorta de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (OB). RNAm para citocinas pró-inflamatórias e IL-10 foi aumentado em AMRs e aorta de OB. O relaxamento não foi alterado, mas a contração foi reduzida em AMRs e aorta de OB. AMRs apresentaram redução global da contração, mas a aorta apresentou redução específica para agonista adrenérgico. Maior modulação negativa por NO e prostanoídes vasodilatadores foi observada em aorta, mas não em AMRs. RNAm para marcador do fenótipo sintético foi aumentado em AMRs de OB. Esses resultados mostram que as células endoteliais e as CMLVs de AMRs e aorta respondem diferentemente à obesidade. Inflamação e mecanismo de contrarregulação são induzidos em AMRs e aorta, que impediria a disfunção endotelial, mas não a mudança fenotípica das CMLVs em AMRs, que então, comprometeria sua capacidade contrátil.

Palavras-chave: Endotélio vascular. Músculo liso vascular. Obesidade. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Soares AG. Obesity leads to artery-specific alterations: evaluation of the endothelial function and smooth muscle cell phenotype. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Obesity may change the characteristics of vascular endothelial cells and smooth muscle cells (VSMCs). Vascular reactivity and gene expression of inflammatory and phenotypic markers for VSMC were evaluated in resistance mesenteric arteries (RMAs) and aorta from mice fed with high fat diet (OB). Pro-inflammatory cytokines and IL-10 mRNA were elevated in OB's RMAs and aorta. The relaxation was unchanged, however a reduction in contractility was observed in OB's RMA and aorta. A global reduction in contractility was observed in RMAs but aorta demonstrated a specific reduction to adrenergic agonist. Higher negative modulation by NO and vasodilator prostanoids were observed only in aorta. Phenotypic marker mRNA was elevated in OB's RMA. The results show that endothelial cells and VSMCs from RMAs and aorta respond differently to obesity. Inflammation and counter regulatory mechanisms are induced in RMAs and aorta of which would prevent endothelial dysfunction but not the VSMC phenotypic switching in RMAs, compromising the contractile ability.

Keywords: Nitric oxide. Obesity. Vascular endothelium. Vascular smooth muscle cell.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Frequência de obesidade na população brasileira.....	19
Figura 2 - Evolução ponderal, índice de Lee, massa dos depósitos de gorduras retroperitoneal e periepídimal e massa dos músculos sóleos e extensor digital longo de camundongos alimentados com ração padrão ou ração hiperlipídica.....	35
Figura 3 - Concentração sérica de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, VLDL, triglicérides e glicose e de TNF α e IL-6 em camundongos controles e obesos.....	36
Figura 4 - Curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nítroprussiato de sódio em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos.....	37
Figura 5 - Curvas concentração-resposta para cloreto de potássio, U46619, noradrenalina e serotonina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos.....	39
Figura 6 - Curvas concentração-resposta à noradrenalina na ausência e na presença de L-NAME, L-NIL e indometacina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos.....	42
Figura 7 - Curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nítroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica de camundongos controles e obesos.....	44
Figura 8 - Curvas concentração-resposta para cloreto de potássio, U46619, noradrenalina e serotonina em anéis aorta torácica de camundongos controles e obesos.....	46
Figura 9 - Curvas concentração-resposta à noradrenalina na ausência e na presença de L-NAME, L-NIL e indometacina em anéis de aorta torácica de camundongos controles e obesos.....	49
Figura 10 - Expressão de RNAm de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, COX-2 e iNOS em artérias mesentéricas e aorta de camundongos controles e obesos.....	51
Figura 11 - Expressão de RNAm de SM22 α e Notch3 em artérias mesentéricas e aorta de camundongos controles e obesos.....	52

Figura 12 - Imagens representativas de cortes corados pela técnica de vermelho de <i>Picro Sirius</i> e expressão de RNAm de colágeno-3 em artérias mesentéricas e aorta de camundongos controles e obesos.....	54
Figura 13 - Expressão de RNAm de p27 e p53 em artérias mesentéricas e aorta de camundongos controles e obesos.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de sobrepeso segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS).....	17
Tabela 2 – Oligonucleotídeos.....	31
Tabela 3 – Relaxamento máximo (%) e sensibilidade (log EC50) à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de resistência.....	38
Tabela 4 – Resposta máxima (mN/mm) induzida pelos agentes contráteis em anéis de artérias mesentéricas de resistência.....	40
Tabela 5 – Resposta máxima (mN/mm) e sensibilidade (log EC50) à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas de resistência incubados com L-NAME, L-NIL e indometacina.....	43
Tabela 6 – Relaxamento máximo (%) e sensibilidade (log EC50) à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta.....	45
Tabela 7 – Resposta máxima (mN) induzida pelos agentes contráteis em anéis de aorta.....	47
Tabela 8 – Resposta máxima (mN/mm) e sensibilidade (log EC50) à noradrenalina em anéis de aorta torácica incubados com L-NAME, L-NIL e indometacina.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância
C57BL/6	camundongo da linhagem C57 Black 6
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio biidratado
CADASIL	arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão Experimental no Uso de Animais
cm	centímetro
CMLV	célula muscular lisa vascular
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	cicloxygenase
EDL	Extensor digital longo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Síntase de óxido nítrico endotelial
epm	erro padrão da média
g	grama
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IL	Interleucina
IMC	índice de massa corpórea
iNOS	Síntase de óxido nítrico induzível
Ip	intraperitoneal
kcal	quilocaloria
KCl	Cloreto de potássio
kg	quilograma
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
L-NAME	nitro-L-arginina-éster
L-NIL	N6-(1-iminoetil)-L-lisina diidroclorido
Log	logarítimo
M	molar
mg	miligrama
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio heptaidratado

mM	milimolar
mm	milímetro
mmHg	milímetro de mercúrio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
NO	óxido nítrico
NOS	Sintase de óxido nítrico
nNOS	Síntase de óxido nítrico neuronal
NOTCH	receptor transmembrana
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFA	paraformaldeído
PBS	Solução tampão de fosfato de sódio
PVAT	Tecido adiposo perivascular
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
Rpm	rotações por minuto
SM22α	Smooth muscle 22α
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
USP	Universidade de São Paulo
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
WHO	World Human Organization
μM	micromolar
μm	micrometro
mN	milinewton
kPa	quilopascal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Obesidade	17
1.1.1 Obesidade e função vascular	20
1.2 Objetivo	25
2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Animais	26
2.1.1 Indução da obesidade	26
2.2 Caracterização dos camundongos obesos	26
2.2.1 Obesidade	26
2.2.2 Perfil Lipídico e hormonal	27
2.2.3 Citocinas pró-inflamatórias circulantes	27
2.3 Estudo Da Reatividade Vascular	27
2.3.1 Artéria mesentérica de resistência	27
2.3.1.1 Normalização das artérias de resistência	28
2.3.2 Aorta	29
2.3.3 Protocolo experimental	29
2.3.3.1 Avaliação da resposta vasodilatadora	30
2.3.3.2 Avaliação da resposta vasoconstritora	30
2.3.3.4 Avaliação da modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo NO e produtos da ciclooxigenase	30
2.4 Determinação Da Expressão De RNAm Por Reação Em Cadeia De Polimerase (PCR) Em Tempo Real	30
2.5 Histologia	32
2.6 Análise estatística	33
3 RESULTADOS	34
3.1 Caracterização do modelo de obesidade	34
3.1.1 Evolução ponderal, índice de lee, massa de gordura e massa magra	34
3.1.2 Concentração sérica de glicose, lipídeos e de citocinas pró-inflamatórias	36
3.2 Reatividade vascular em anéis de artérias mesentéricas de resistência	37
3.2.1 Resposta vasodilatadora em anéis de artérias mesentéricas à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio	37
3.2.2 Resposta vasoconstritora em anéis de artérias mesentéricas de resistência	39

3.2.3 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo óxido nítrico e produtos da cicloxigenase.....	41
3.3 Reatividade vascular em anéis de aorta	44
3.3.1 Reposta vasodilatadora em anéis de aorta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio	44
3.3.2. Resposta vasoconstritora em anéis de aorta	46
3.3.3 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo óxido nítrico e produtos da cicloxigenase	48
3.4 Expressão do RNAm de marcadores inflamatórios em artérias mesentéricas e aorta	51
3.5 Expressão do RNAm de marcadores de fenótipo do músculo liso em artérias mesentéricas e aorta.....	52
3.6 Conteúdo de colágeno em artérias mesentéricas e aorta	53
3.7 Expressão do RNAm de marcadores de senescência celular em artérias mesentéricas e aorta.....	55
4 DISCUSSÃO.....	56
5 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Obesidade é definida como o excesso de gordura acumulada nos diversos depósitos distribuídos pelo organismo. O índice de massa corpórea (IMC) é utilizado para classificar os indivíduos levando-se em conta a massa corpórea e altura. Atualmente outras metodologias são aplicadas para uma classificação mais precisa, são exemplos destas o comprimento da circunferência abdominal, que possui uma correlação positiva com doenças cardiovasculares, a espessura da pele e bioimpedância (Kopelman, 2000). Cada uma destas metodologias apresentam suas vantagens e desvantagens. O IMC ($\text{peso em kg} / \text{altura}^2$) está correlacionado com a medida de densidade corporal, no entanto não tem a capacidade de distinguir entre massa magra (músculo) e massa gorda (tecido adiposo). Ainda assim, a Organização Mundial de Saúde define a obesidade como um IMC acima de 30 (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de sobrepeso segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

IMC ($\text{kg} \times \text{m}^{-2}$)	Classificação OMS	Descrição popular
< 18,5	Baixo peso	Magro
18,5 – 24,9	-	Saudável, normal
25,0 – 29,9	Sobrepeso de Grau 1	Sobrepeso
30,0 – 39,9	Sobrepeso de Grau 2	Obesidade
$\geq 40,0$	Sobrepeso de Grau 3	Obesidade Mórbida

IMC, índice de massa corpórea.

Obesidade e sobrepeso são duas manifestações clínicas caracterizadas por alterações no metabolismo e no comportamento. Motivo este que têm levado alguns pesquisadores a classificar a obesidade como doença (Allison et al., 2008). A obesidade refere-se especificamente ao acúmulo excessivo de tecido adiposo, onde tanto o bem-estar quanto a saúde do indivíduo portador desta condição estão prejudicados. Além do mais a obesidade pode ser classificada de acordo com os depósitos de tecido adiposo no organismo. A obesidade visceral (central ou androide) é aquela em que o tecido adiposo visceral leva ao aumento na

circunferência abdominal e é mais comum em homens. A obesidade periférica (ginoide) acomete depósitos de gordura subcutâneos e é mais frequente em mulheres. Essa metodologia de caracterização acaba fornecendo um parâmetro mais preciso na determinação da obesidade e da sua relação com doenças cardiovasculares (Janssen et al., 2004).

Com uma alta prevalência na população em países desenvolvidos e em desenvolvimento, há alguns anos a obesidade tem sido considerada uma epidemia. A Organização Mundial da Saúde estima que até o ano 2030 cerca de 370 milhões de pessoas serão obesas (Alam et al., 2012; Kopelman, 2000).

No Brasil, segundo a publicação “Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009” do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), aproximadamente 50% da população tem excesso de peso, enquanto a porcentagem de indivíduos obesos é de 12% no sexo feminino e de 16% no sexo masculino, e estima-se que um terço da população brasileira será obesa nos próximos 10 anos. Divulgado no final do mês de maio de 2014, a pesquisa “Vigitel” (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, 2014), realizada pelo Ministério da Saúde, apontou que, após aumentos constantes nos últimos 8 anos, o índice de indivíduos obesos no Brasil está estabilizado (Figura 1). Destaca-se nos estudos epidemiológicos, o fato da obesidade acometer uma grande quantidade de crianças ou indivíduos na fase juvenil (IBGE, 2010; Reinehr, 2013; WHO, 2014).

Frequência de obesidade na população brasileira

Figura 1 - Fonte: Vigitel, Ministério da Saúde, Brasil, 2014.

A ingestão de alimentos com o intuito de se obter a quantidade necessária de energia para manter o organismo é essencial para a sobrevivência, entretanto o excesso da ingestão é um dos pilares no desenvolvimento da obesidade. Aumento do consumo energético tem impacto sobre o volume e pressão sanguíneos, termorregulação, estresse psicológico e obviamente o metabolismo (Begg, Woods, 2013).

Fatores culturais têm sido atribuídos ao aumento nos índices de indivíduos obesos. Características socioeconômicas, urbanização e dietas inadequadas são algumas características culturais importantes. Um exemplo do impacto socioeconômico é aquele em que uma família de baixa renda passa a ter condições financeiras para consumir alimentos industrializados ricos em gorduras e sódio (Malik et al., 2013).

A genética possui um papel chave no desenvolvimento da obesidade. Mais de 50 genes foram associados com obesidade e, ainda assim, muito pouco se sabe sobre a relação destes com a grande variação do IMC em humanos (Sandholt et al., 2012).

Obviamente, a falta de atividade física associada aos fatores já citados demonstra como a relação entre eles é extremamente danosa ao organismo, uma vez que o desequilíbrio energético (ingesta > consumo) culmina em aumento dos depósitos de gordura distribuídos no organismo (Hill et al., 2012; Kopelman, 2000).

Aumento da ingestão de alimentos ricos em gorduras levam à resistência à insulina, dislipidemia, hiperleptinemia, estresse oxidativo e hipertensão (Abate, 1996; Avogaro, Kreutzenberg, 2005; Barnard et al., 1998; Bastien et al., 2014; Ghibaudi et al., 2002; Roberts et al., 2006). Todos esses parâmetros estão relacionados ao aumento no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (Michas et al., 2014).

Outro parâmetro importante é a liberação de diversos mediadores inflamatórios pelos adipócitos, levando a uma inflamação sistêmica. Assim, a inflamação presente na obesidade passa a ter um papel importante no desenvolvimento de outras patologias em indivíduos obesos, por exemplo, a associação entre doença coronariana e obesidade se deve a vias relacionadas à inflamação (Bahrami et al., 2008). O aumento do tecido adiposo promove inflamação sistêmica devido à secreção de fatores pró-inflamatórios, como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), leptina e inibidor do ativador de plasminogênio-1 (Berg, Scherer, 2005; Thalmann, Meier, 2007). Tais fatores exercem efeitos sistêmicos sobre o metabolismo da glicose (Kim et al., 2004), o metabolismo dos lipídios (Klover et al., 2003) e da função cardiovascular (Wimalasundera et al., 2003). Ainda, a obesidade parece induzir inflamação vascular, pois foi demonstrado que aorta de camundongos fêmeas obesas apresentou aumento da expressão proteica de TNF- α e da ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e a inibição local do NF- κ B foi capaz de corrigir a disfunção endotelial, avaliada pelo relaxamento dependente do endotélio (Kobayasi et al., 2010).

1.1.1 Obesidade e função vascular

Responsável por transportar oxigênio e nutrientes para os tecidos e remover os produtos do metabolismo, o sistema vascular tem participação ativa na manutenção da homeostasia. O endotélio vascular possui um papel chave nesse processo, uma vez que o mesmo atua não somente como barreira passiva entre plasma e líquido extracelular, mas também como fonte de um grande número de mediadores. Estes controlam ativamente o tônus vascular, bem como influenciam as

funções plaquetárias, das células mononucleares e a hemostasia (Kalebic et al., 1983; Fischer et al., 2006).

As células endoteliais estão envolvidas em atividades metabólicas intensas com uma grande heterogeneidade na qual deve-se considerar fatores como o leito vascular, o tamanho ou o tipo do vaso (artérias, veias ou capilares) (Aird, 2007a; Aird, 2007b). Além de seu envolvimento na hemostasia, as células endoteliais podem metabolizar ou inativar inúmeros fatores circulantes como hormônios polipeptídicos vasoativos, aminas, nucleotídeos, lipoproteínas, metabólitos do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio (Fischer et al., 2006).

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador do sistema nervoso e do sistema cardiovascular e está envolvido nas respostas dos macrófagos a estímulos inflamatórios, tais como lipopolissacarídeos bacterianos e interferon- γ , e na sua capacidade de matar células tumorais ou bactérias (Hibbs et al., 1987; Stuehr, Marletta, 1987). Existem diferentes tipos de enzimas responsáveis pela síntese de NO: NO sintase endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). Na parede vascular, os três tipos podem estar presentes. A nNOS é expressa não só em nervos perivasculares, mas também pode ser detectada em células endoteliais e do músculo liso (Boulanger et al., 1998). A expressão de iNOS foi detectada em todas as células nucleadas do sistema cardiovascular (Papapetropoulos et al., 1999). A eNOS é expressa não só em células endoteliais mas também em miócitos cardíacos e plaquetas (Balligand et al., 1993; Sase, Michel, 1995). As três enzimas NOS contêm um domínio redutase e um oxigenase e possuem como substrato a L-arginina, que na presença de oxigênio molecular, catalisam a oxidação de cinco elétrons de um dos átomos de nitrogênio da L-arginina. Todas exigem a presença dos cofatores NADPH, FAD, FMN, heme, tetrahydrobiopterina (BH₄) e zinco (Bredt, Snyder, 1994). A conversão de L-arginina a NO pela eNOS e nNOS é dependente de cálcio enquanto a ativação da iNOS é independente de cálcio (Bredt, 1999).

Diversos são os fatores de risco, como sobrepeso, tabagismo, diabetes, aumento da pressão arterial e níveis elevados de lipídios circulantes, que podem promover alterações no endotélio vascular, levando a uma redução na biodisponibilidade de NO e desse modo alterar a homeostasia vascular (Bastien et al., 2014). As comorbidades que frequentemente estão associadas à obesidade também possuem um papel importante na promoção de alterações na função vascular, promovidas por citocinas pró-inflamatórias, pelo aumento da formação de

espécies reativas de oxigênio e de produtos de glicação avançada (Hofmann et al., 2014). Logo, é de se esperar que com as diversas alterações metabólicas alterações estruturais/funcionais sejam observadas na vasculatura de indivíduos obesos (Rizzoni et al., 2011).

As células musculares lisas (CMLVs) são o único tipo celular da camada média e as principais células estromais da parede vascular, assumindo uma variedade de diferentes funções fisiológicas e estruturais. Por exemplo, as CMLVs produzem componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento, tornando possível que a parede arterial tenha capacidade de suportar a alta pressão do sangue circulante, e participam da reparação arterial depois de injúrias na vida adulta. Nos vasos de resistência, as CMLVs mantêm um tônus contrátil variável, que regula a pressão arterial e a redistribuição do fluxo sanguíneo. Devido à pressão gerada, estresse mecânico e deformação são gerados na parede arterial de vasos de resistência e de condutância, fazendo com que uma condutância hidráulica radial ocorra através da parede, carregando substâncias solúveis a partir da corrente sanguínea. As CMLVs na camada média são altamente responsivas ao estresse mecânico e às moléculas carregadas radialmente, modificando o ambiente da parede vascular.

O músculo liso vascular adquire um fenótipo, que pode variar ao longo de um contínuo de um espectro, onde em uma extremidade está o fenótipo contrátil quiescente e na outra o fenótipo sintético proliferativo, por causa da sua capacidade em reprogramar o padrão de expressão de genes específicos. A CMLV apesar de encontrar-se num estado quiescente em indivíduos adultos, altera sua programação e o seu fenótipo em resposta a fatores de crescimento, forças mecânicas, interações célula-célula e célula-matriz, bem como a vários mediadores inflamatórios (Kawai-Kowase, Owens, 2007; Morrow et al., 2005a). A CMLV mantém o fenótipo contrátil em condições fisiológicas normais, como resultado de uma regulação balanceada da expressão de genes contráteis e sintéticos (Proweller et al., 2005). Durante o processo de remodelamento vascular em decorrência dos estímulos diversos aos quais a vasculatura está exposta, diferentes genes passam a ter um papel importante na regulação desse processo. Dentre eles, podemos citar o Notch 3 pertencente à família de genes que codificam grandes receptores transmembranas responsáveis por transdução de sinais entre células vizinhas. É uma via de sinalização altamente conservada durante a evolução, e crítico durante o

desenvolvimento embrionário (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Baron, 2003; Baron et al., 2002; Bray, 2006). Em mamíferos existem 4 tipos de receptores Notch (1-4) e cinco ligantes, Jagged1 e 2, tipo-Delta 1, 3 e 4, sendo esses ligantes proteínas transmembranas.

No sistema cardiovascular, a sinalização via receptores Notch participa de diversos aspectos do desenvolvimento incluindo vasculogênese, angiogênese, diferenciação e remodelamento da célula muscular lisa (Alva, Iruela-Arispe, 2004; Iso et al., 2003); e alterações na via de sinalização do receptor Notch pode levar a um desenvolvimento vascular anormal (Wang et al., 2008).

Em humanos adultos, a isoforma Notch 3 é expressa somente na CMLV (Villa et al., 2001). A importância funcional do receptor Notch 3 na CMLV adulta é demonstrada em condições genéticas causada pela mutação neste gene levando a condição CADASIL (arteriopatía cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia). Essa condição afeta o fluxo em pequenos vasos sanguíneos cerebrais onde as CMLV são anormais, levando a morte de células vasculares de forma gradativa (Joutel et al., 2000).

Como exemplo de um processo inflamatório na vasculatura, a aterosclerose apresenta detalhes importantes para se entender as alterações estruturais locais em resposta a estímulos pró-inflamatórios. As alterações patológicas na estrutura do vaso se devem, em parte, por mudanças nas vias de sinalização que regulam a transição de CMLV de seu fenótipo contrátil para um fenótipo que permita que elas migrem para a camada íntima (Lusis, 2000; Ross, 1999). Uma vez diferenciadas e realocadas, as CMLVs são capazes de sintetizar e secretar diversas proteínas da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos) que são requisitados para gerar a capa fibrosa que encapsulará as células esponjosas.

Durante esse processo, há a participação dos componentes da via de sinalização Notch. Notch 1 e Notch 3 regulam alterações nas CMLVs e controlam o crescimento e migração em resposta a fatores de crescimento devido à injúria vascular (Morrow et al., 2008; Sweeney et al., 2004). Notch 3 também promove resistência a apoptose em CMLV na camada íntima, o que é uma característica da resposta à lesão vascular e regula a consequente formação da camada neointima. (Campos et al., 2002; Sweeney et al., 2004; Wang et al., 2002b). A sinalização via Notch também reprime a diferenciação celular dependente de miocardina em CMLVs e a manutenção do fenótipo contrátil destas células (Proweller et al., 2005).

A proteína SM22 α é uma proteína do citoesqueleto que se liga a actina, sendo considerada um marcador do fenótipo contrátil em CMLV, e está envolvida em doenças vasculares como aterosclerose, onde sua expressão apresenta-se reduzida (Sobue et al., 1999; Weissberg et al., 1995). Shen e colaboradores (2011) demonstraram que redução da expressão desta proteína está relacionada com o estado inflamatório das CMLV. Assim, uma redução na expressão de SM22 α seria considerado um marcador de inflamação celular e um importante alvo terapêutico para o tratamento de doenças vasculares (Shen et al., 2011).

Mudança para um fenótipo sintético das CMLVs está entre as alterações vasculares que ocorre no envelhecimento (Lacolley et al., 2012). Outras alterações incluem síntese de matriz extracelular, perfil pró-inflamatório, apoptose e senescência celular. Senescência celular é definida biologicamente como uma parada irreversível do ciclo celular ou redução da capacidade replicativa de uma célula após certo número de divisões, porém pode ocorrer em resposta ao aumento da expressão de fatores de supressão tumoral, como p53, p27 e p21, independentemente da idade replicativa da célula, e é considerada um mecanismo de supressão tumoral (Campisi, 1996). A mudança fenotípica das CMLVs no envelhecimento pode ter influência no processo de senescência celular, que por fim, levaria a alterações vasculares típicas do envelhecimento. A senescência celular se instala progressivamente no processo de envelhecimento, mas é acelerada por vários fatores de risco cardiovascular, tal como a obesidade, devido a ativação de vias inflamatórias (Erusalimsky, 2009; Versari et al., 2009; Wang et al., 2009).

Os estímulos físicos e mecânicos aos quais as CMLVs estão expostas variam de leito para leito por causa da função e localização de cada tipo de artéria. No entanto, o tecido adiposo perivascular (PVAT), que recobre a adventícia de praticamente todos os vasos sanguíneos do organismo, exceto a vasculatura cerebral, também varia de leito para leito (Gu, Xu, 2013; Szasz et al., 2013.). O PVAT secreta várias substâncias que agem de maneira parácrina sobre a parede vascular, modulando o tônus vascular e o perfil inflamatório (Szasz et al., 2013), mas o conjunto de substâncias secretadas varia de acordo com o tipo de PVAT. O PVAT da aorta torácica se assemelha ao tecido adiposo marrom e do leito mesentérico, da aorta abdominal e artérias coronárias se assemelha ao tecido adiposo branco visceral (Padilla et al., 2013). Essas diferenças podem refletir no microambiente

gerado pelos diferentes PVAT, pois foi demonstrado que o PVAT marrom de camundongos alimentados com ração hiperlipídica por 13 semanas possui maior resistência à inflamação do que o tecido adiposo branco visceral (Fitzgibbons et al., 2011). Portanto, podemos pensar que devido a essas diferenças, as alterações na parede vascular induzidas pela obesidade sejam leito-específicas.

Pelo exposto, fica claro que a estabilidade fenotípica das CMLVs é importante para a manutenção das funções vasculares. Considerando que a obesidade é caracterizada por um fenótipo vascular pró-inflamatório, que poderia levar à mudança fenotípica das CMLVs, e que as respostas dessas células aos estímulos inflamatórios dependem do microambiente em que elas estão inseridas e, que portanto, são leito-específicas, a nossa hipótese é que a obesidade altera diferentemente a reatividade de artérias de resistência e de condutância e que o perfil de expressão de genes inflamatórios, de marcadores de fenótipo de CMLVs e de senescência celular acompanham essa diferença.

1.2 Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da obesidade sobre a reatividade e o perfil de genes inflamatórios e de marcadores de fenótipo de CMLV e de senescência celular em artérias mesentéricas de resistência e de aorta torácica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) (195/11/CEUA), que segue os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório.

Camundongos C57BL/6J de 4 semanas de idade, provenientes do Biotério de Isogênicos do Departamento de Imunologia, situado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, foram divididos em dois grupos: I) camundongos que receberam ração padrão (Controle); II) camundongos que receberam dieta hiperlipídica (Obeso). Os camundongos foram mantidos durante todo o período experimental em caixas de polipropileno com livre acesso à água e ao alimento. As caixas foram acondicionadas no Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia (ICB/USP) que possui temperatura controlada de 22 ± 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas.

2.1.1 Indução da obesidade

A obesidade foi induzida por dieta 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 et al. (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.

2.2 Caracterização dos camundongos obesos

2.2.1 Obesidade

Os camundongos foram pesados semanalmente, desde a 4ª semana de vida até a 20ª semana, para a avaliação da evolução ponderal. Para caracterização e confirmação da eficácia da dieta hiperlipídica, a obesidade foi avaliada pela

determinação do Índice de Lee {[massa corporal^{1/3} (g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100}, da massa relativa (mg/g massa corpórea) das gorduras periepídimal e retroperitoneal e dos músculos sóleo e extensor digital longo (EDL).

2.2.2 Perfil lipídico e hormonal

O alimento foi retirado às 08:00 horas da manhã e, após 4 horas, os camundongos foram anestesiados com mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg) (i.p.) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, em seguida, o soro foi obtido por centrifugação (3.000 rpm por 15 minutos) e armazenados a -80 °C para posterior determinação sérica de colesterol total, HDL, triglicérides e insulina. Os lipídeos foram dosados por ensaios colorimétricos (kits Liquiform, Labtest, Brasil). A glicose foi determinada por fitas reativas “OneTouch-Ultra” e glicosímetro “OneTouch-Lifescan” (Johnson & Johnson, New Brunswick, New Jersey, EUA) utilizando amostras de sangue obtidas por punção submandibular de animais acordados e em jejum de 6 horas.

2.2.3 Citocinas pró-inflamatórias circulantes

O alimento foi retirado às 08:00 horas da manhã e, após 4 horas, os camundongos foram anestesiados com mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg) (i.p.) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, em seguida, o soro foi obtido por centrifugação (3.000 rpm por 15 minutos) e armazenados a -80 °C para posterior determinação sérica de TNF α e IL-6 plasmáticas. Para tal utilizamos kits de ELISA segundo orientações do fabricante (BD OptEIA, Franklin Lakes, New Jersey, EUA).

2.3 Estudo da reatividade vascular

2.3.1 Artéria mesentérica de resistência

O método descrito por Mulvany e Halpern (1977) foi utilizado para este propósito. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg). O leito mesentérico foi removido e

colocado em uma placa de Petri contendo solução 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). 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. Dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e fixados em um miógrafo de força (MultWire Myograph System 620M, DMT, Aarhus, Dinamarca) para o estudo da tensão isométrica. Esse miógrafo, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Bella Vista, New South Wales, Austrália) e este a um computador.

2.3.1.1 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, Halpern, 1977).

Após o período de estabilização e aquecimento dos segmentos vasculares (15 minutos) em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4 e a 37 °C), gaseificado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, as artérias mesentéricas foram distendidas de forma gradativa e a leitura da distância dos arames (µm) e da força aplicada foram registrados a cada ponto. Utilizando-se programa de normalização (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália), foi calculada a circunferência interna (µm), a partir da distância dos 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 [$P = \text{tensão da parede} / (\text{circunferência interna} / (2 \cdot \pi))$], 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 $IC1 = 0,90 \times IC100$, 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 π .

2.3.2 Aorta

A aorta torácica descendente foi dissecada, removendo-se todo o tecido conectivo e adiposo, evitando estiramento excessivo para não lesar o endotélio, sendo rapidamente imersa em solução Krebs-Henseleit a 4 °C. A aorta foi seccionada em dois anéis transversais de 2,0 mm. Os anéis de aorta foram então colocados em cuba contendo solução de Krebs-Henseleit em pH 7,4 a 37°C, gaseificado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, onde ganchos de 200 µm de diâmetro foram inseridos no lúmen dos anéis e fixados em um miógrafo de força 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.

2.3.3 Protocolo experimental

Após 15 minutos do processo de normalização, os anéis de artérias mesentéricas foram contraídos com a administração de cloreto de potássio (KCl, 120 mM), com a finalidade de avaliar a integridade do músculo liso. Após cada estímulo com KCl as artérias foram lavadas três vezes usando solução de Krebs-Henseleit. A administração de KCl foi repetida por mais duas vezes com intervalo de 15 minutos entre cada administração, onde foi alcançada uma estabilidade na resposta de despolarização do músculo liso ao KCl. Após 15 minutos da última administração de 120 mM de KCl, as preparações foram pré-contraídas com noradrenalina (1 µM), e a integridade do endotélio foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (1 µM, vasodilatador dependente do endotélio) em induzir relaxamento. Os anéis foram lavados com solução de Krebs e após 30 minutos de estabilização, curvas concentração-resposta foram realizadas como descritas abaixo.

Os anéis de aorta permaneceram por um período de 60 minutos para estabilização, sob tensão de 4,9 mN com trocas de solução nutritiva e ajuste de tensão a cada 15 minutos. Após este período os anéis foram contraídos com 100 nM de noradrenalina seguido de 1 µM de acetilcolina para verificar a integridade do

endotélio. As preparações foram lavadas 3 vezes com solução nutriente, estabilizadas por 60 minutos e curvas concentração-resposta foram realizadas.

2.3.3.1 Avaliação da resposta vasodilatadora

Após o período de estabilização, os segmentos das artérias foram pré-contráidas com 1 μ M de U46619 e curvas concentração-resposta foram realizadas com solução de acetilcolina (vasodilatador dependente do endotélio) e de nitroprussiato de sódio (doador de NO) em concentrações crescentes (10 pM a 300 μ M) de maneira cumulativa.

2.3.3.2 Avaliação da resposta vasoconstritora

Após o período de estabilização, curvas concentração-resposta foram realizadas com solução de KCl (1 mM a 108 mM), noradrenalina (10 pM a 300 μ M), mimético do tromboxano U46619 (1 pM a 30 μ M) e serotonina (1 nM a 300 μ M) em concentrações crescentes de maneira cumulativa.

2.3.3.4 Avaliação da modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo NO e produtos da cicloxigenase

Após o período de estabilização, o inibidor não seletivo da NO sintase, nitro-L-arginina-éster (L-NAME; 100 μ M), o inibidor seletivo da NO sintase induzível, N6-(1-iminoetil)-L-lisina diidroclorido (L-NIL; 10 μ M), e o inibidor não seletivo da cicloxigenase, indometacina (10 μ M), foram adicionados aos anéis e, após 15 minutos, curva concentração-resposta para noradrenalina (10 pM a 300 μ M) foi realizada.

2.4 Determinação da expressão de RNAm por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real

A expressão de RNAm para TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, COX-2, p27, p53, colágeno tipo 3, iNOS, Notch3, SM22 α e ciclofilina foi avaliada por PCR em tempo real em artérias do leito mesentérico e aorta de camundongos controles e obesos. Para tal, toda as artérias foram removidas de camundongos anestesiados com

injeção intraperitoneal de mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg) e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o processamento. O RNA total foi obtido utilizando-se o método de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Após esse procedimento, 2 µg do RNA total de cada amostra foram utilizados para obtenção da fita de cDNA pelo método da transcriptase reversa. PCR em tempo real foi realizado em um volume final de 12,5 µL contendo oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK. A especificidade da reação com SYBR® Green foi confirmada pela análise da curva de dissociação. As reações de PCR foram realizadas e analisadas usando-se o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Sydney, New South Wales, Austrália). A expressão de RNAm foi quantificada utilizando-se o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001). A normalização das amostras foi realizada utilizando-se o RNAm para ciclofilina (controle interno padronizado). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos.

Gene	Sequência
<i>TNFα</i>	F – ATGAGCACAGAAAGCATGATC
	R – TACAGGCTTGTCACCTCGAATT
<i>IL-1β</i>	F – TGACCCATGTGAGCTGAAAG
	R – GGGATTTTGTCTGTTGCTTGT
<i>IL-6</i>	F – ACCACCCACAACAGACCAGT
	R – CAGAATTGCCATTGCACAAC
<i>IL-10</i>	F – CATGGGTCTTGGGAAGAGAA
	R – GCTTTCGAGACTGGAAGTGG
<i>COX-2</i>	F – AGATCAGAAGCGAGGACCTG
	R – CCATCCTGGAAAAGTCGAAG
<i>p27</i>	F – AGTGTCCAGGGATGAGGAAG
	R – GGGGAACCGTCTGAAACATT
<i>p53</i>	F – GTTCCGAGAGCTGAATGAGG
	R – TTTTATGGCGGGACGTAGAC
<i>Colageno-3</i>	F – GGGATCCAATGAGGGAGAAT

	R – GGCCTTGCGTGTTTGATATT
<i>NOTCH-3</i>	F – GCGTTTGCCAGAGTTCAGTG
	R – GAGCAGTCTGGGCCTTGGAA
<i>SM22α</i>	F – TCGGTGGCTACATTGGGAAT
	R – AATGCTTGGAGCAAGGGTCA
<i>iNOS</i>	F - GGATATCTTCGGTGCGGTCTT
	R - GCTGTAACCTCTTCTGGGTGTCAGA
<i>Ciclofilina</i>	F – TATCTGCACTGCCAAGACTGAAT
	R – CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC

2.5 Histologia

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de mistura de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg). Ao atingirem o nível cirúrgico foram submetidos a laparotomia e tiveram o mesentério cuidadosamente exposto e a aorta retirada. A artéria mesentérica superior foi canulada com cateter de polietileno (PE-10 conectado a PE-50), introduzido cerca de 0,5 a 1,0 cm distante da aorta abdominal e o leito mesentérico foi perfundido, com fluxo constante de 2,0 mL/min de solução de PBS + paraformaldeído à 4% (solução PFA) por um período de 20 minutos. Seguimentos de artéria mesentérica foram então coletados e mantidos em solução PFA por 2 horas e então transferidos para solução de álcool 70%. Os seguimentos de aorta foram coletados e após lavados em solução de PBS foram então transferidos para solução de PFA por 2 horas, e então transferidos para solução de álcool 70%. Os vasos foram então desidratados com banhos consecutivos de álcool em concentrações crescentes (70, 80, 90, 95 e 100%). Em seguida, os vasos sofreram o processo de diafanização com Xilol em três incubações (Xilol I, II e III). Após este processo os vasos foram então parafinizados e emblocados. Cortes histológicos de 7 μ m foram obtidos e em seguida corados com a solução de *Picro Sirius* para identificação e quantificação *in situ* de colágeno.

2.6 Análise estatística

A resposta máxima em mN de tensão e a concentração do agonista que induz metade da resposta máxima EC_{50} expressa como $\log EC_{50}$ foram calculados a partir das curvas concentração-resposta. Para cada curva concentração-resposta, a resposta máxima e a EC_{50} foram calculadas utilizando-se análise de regressão não linear (GraphPadPrism Software). Os resultados foram expressos como médias $\pm$ erro padrão da média (epm). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer ou teste “t de Student” não pareado quando apropriado. O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização do modelo de obesidade

3.1.1 Evolução ponderal, índice De Lee, massa de gordura e massa magra

A figura 2A mostra a evolução ponderal de camundongos ao longo de 16 semanas, durante as quais receberam ração padrão (controle) ou ração hiperlipídica (obeso). Camundongos que receberam ração hiperlipídica apresentaram maior ganho de massa corpórea em relação aos que receberam ração padrão a partir da 9ª semana do início da dieta (Figura 2A).

Ao final das 16 semanas, camundongos alimentados com ração hiperlipídica (obeso) apresentaram maior índice de Lee (Figura 2B) e maior massa das gorduras retroperitoneal e periepídimal (Figura 2C) do que os alimentados com ração padrão (controle). A massa dos músculos sóleos dos animais obesos foi reduzida em relação ao grupo controle, enquanto a massa do músculo EDL não foi diferente (Figura 2D).

Figura 2 – Evolução ponderal (A), índice de Lee {[massa corpórea^{1/3}(g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100} (B), massa dos depósitos de gorduras retroperitoneal e periepididimal (C) e massa dos músculos sóleos e extensor digital longo (EDL) (D) de camundongos alimentados com ração padrão (CONTROLE) ou ração hiperlipídica (OBESO). Cada ponto representa média ± e.p.m. da massa corpórea. As barras representam a média da massa em miligramas por grama de massa corpórea ± e.p.m. Anova-duas vias ou teste *t*-Student: * $p < 0,05$ versus Controle. $n=15$ por grupo.

3.1.2 Concentração sérica de glicose, lipídeos e de citocinas pró-inflamatórias

A concentração sérica de triglicérides e de VLDL foi semelhante nos animais que receberam dieta padrão e hiperlipídica (Figura 3A). Entretanto, a concentração sérica de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL e glicose foi aumentada em camundongos obesos (Figura 3A). Os níveis séricos de TNF α , mas não de IL-6, estão aumentados em camundongos que receberam dieta hiperlipídica (Figura 3B).

Figura 3 – Concentração sérica de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, VLDL, triglicérides e glicose (A) e de TNF α e IL-6 (B) em camundongos controles e obesos. As barras representam a média da concentração $\pm$ e.p.m. Teste *t-Student*: * $p < 0,05$ versus Controle. $n = 5-7$ por grupo.

3.2 Reatividade Vascular Em Anéis De Artérias Mesentéricas De Resistência

O diâmetro dos anéis de artérias mesentéricas de resistência não foi diferente entre os grupos controle e obeso (Controle: $222,9 \pm 7,3 \mu\text{m}$; Obeso: $211,5 \pm 10,1 \mu\text{m}$; $n = 26$).

3.2.1 Resposta vasodilatadora em anéis de artérias mesentéricas à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio

A resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina (Figura 4A; Tabela 3) e nitroprussiato de sódio (Figura 4B, Tabela 3) foi similar em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos obesos e controles.

Figura 4 – Curvas concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao niroprussiato de sódio (B) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos. Cada ponto representa a média $\pm$ e.p.m. da porcentagem de relaxamento em relação à contração induzida pelo mimético do tromboxano U46619. $n = 12$ por grupo.

Tabela 3 – Relaxamento máximo (%) e sensibilidade (log EC50) à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas de resistência.

	Controle	Obeso
Acetilcolina		
Relaxamento (%)	91,6 ± 3,2	89,5 ± 3,1
Log EC50	-7,1 ± 0,2	-7,1 ± 0,1
Nitroprussiato de Sódio		
Relaxamento (%)	92,6 ± 2,3	87,8 ± 2,7
Log EC50	-8,0 ± 0,2	-8,2 ± 0,1

Os valores representam a média ± e.p.m. da porcentagem de relaxamento máximo em relação à contração induzida pelo mimético do tromboxano U46619 e do log da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos. n = 12 por grupo.

3.2.2 Resposta vasoconstritora em anéis de artérias mesentéricas de resistência

Anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos obesos apresentaram redução da resposta vasoconstritora induzida por cloreto de potássio, U46619, noradrenalina e serotonina (Figura 5, Tabela 4).

Figura 5 – Curvas concentração-resposta para cloreto de potássio (A), U46619 (B), noradrenalina (C) e serotonina (D) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos. Cada ponto representa a média $\pm$ e.p.m. da tensão desenvolvida em resposta ao agente utilizado. $n = 5$ (cloreto de potássio), $n = 12-13$ (U46619), $n = 12-13$ (noradrenalina) e $n = 5$ (serotonina) por grupo.

Tabela 4 – Resposta máxima (mN/mm) induzida pelos agentes contráteis em anéis de artérias mesentéricas de resistência.

	Controle	Obeso
Cloreto de Potássio		
Tensão (mN/mm)	1,73 ± 1,16	1,03 ± 0,04*
U46619		
Tensão (mN/mm)	1,91 ± 0,19	1,31 ± 0,21*
Noradrenalina		
Tensão (mN/mm)	2,21 ± 0,22	1,46 ± 0,13*
Serotonina		
Tensão (mN/mm)	0,20 ± 0,04	0,06 ± 0,02*

Os valores representam a média ± e.p.m. da tensão máxima desenvolvida pelas artérias mesentéricas de resistência em resposta aos agentes utilizados. Teste *t-Student*: * $p < 0,05$ versus Controle. n = 5 (cloreto de potássio), n = 12-13 (U46619), n = 12-13 (noradrenalina) e n = 5 (serotonina) por grupo.

3.2.3 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo óxido nítrico e produtos da cicloxigenase

A incubação de anéis de artérias mesentéricas de resistência com L-NAME potencializou a resposta vasoconstritora à noradrenalina no grupo controle e obeso (Figura 6A, Tabela 5). Na presença de L-NAME, a sensibilidade à noradrenalina ainda foi reduzida em artérias de camundongos obesos em relação aos camundongos controles (Figura 6A, Tabela 5).

Anéis de artérias mesentéricas de camundongos controles incubados com L-NIL apresentaram maior sensibilidade à noradrenalina em relação aos anéis não incubados (Figura 6B, Tabela 5). Por outro lado, a resposta à noradrenalina de anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos obesos não foi modificada na presença de L-NIL (Figura 6B, Tabela 5).

A resposta contrátil à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos não foi modificada pela incubação com indometacina (Figura 6C, Tabela 5).

Figura 6 – Curvas concentração-resposta à noradrenalina na ausência e na presença de L-NAME (A), L-NIL (B) e indometacina (C) em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e obesos. Cada ponto representa a média $\pm$ e.p.m. da tensão desenvolvida em resposta ao agonista. $n = 5$ por grupo.

Tabela 5 – Resposta máxima (mN/mm) e sensibilidade (log EC50) à noradrenalina em anéis de artérias mesentéricas de resistência incubados com L-NAME, L-NIL e indometacina.

	CONTROLE	OBESO
Noradrenalina		
Tensão (mN/mm)	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1*
Log EC50	-7,8 ± 0,1	-7,7 ± 0,2
L-NAME		
Tensão (mN/mm)	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,3 [#]
Log EC50	-8,2 ± 0,1 [#]	-7,8 ± 0,1*
L-NIL		
Tensão (mN/mm)	2,5 ± 0,3	1,5 ± 0,2*
Log EC50	-8,2 ± 0,2 [#]	-8,0 ± 0,2
Indometacina		
Tensão (mN/mm)	2,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1*
Log EC50	-7,8 ± 0,2	-7,4 ± 0,2

Os valores representam média ± e.p.m. da tensão máxima desenvolvida e do log da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50) induzida pela noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência. ANOVA uma via: * p < 0,05 versus controle; [#] p < 0,05 versus noradrenalina. n = 5 por grupo.

3.3 Reatividade vascular em anéis de aorta

3.3.1 Resposta vasodilatadora em anéis de aorta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio

A resposta vasodilatadora induzida por acetilcolina (Figura 7A, Tabela 6) e nitroprussiato de sódio (Figura 7B, Tabela 6) foi semelhante em anéis de aorta de camundongos obesos e controles.

Figura 7 – Curvas concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao nitroprussiato de sódio (B) em anéis de aorta torácica de camundongos controles e obesos. Cada ponto representa a média $\pm$ e.p.m. da porcentagem de relaxamento em relação à contração induzida pelo mimético do tromboxano U46619. n = 6-7 por grupo.

Tabela 6 – Relaxamento máximo (%) e sensibilidade (log EC50) à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta.

	Controle	Obeso
Acetilcolina		
Relaxamento (%)	75,9 ± 4,5	75,6 ± 5,9
Log EC50	-7,4 ± 0,2	-7,7 ± 0,1
Nitroprussiato de Sódio		
Relaxamento (%)	95,5 ± 1,7	96,0 ± 2,2
Log EC50	-7,7 ± 0,2	-7,9 ± 0,1

Os valores representam a média ± e.p.m. da porcentagem de relaxamento máximo em relação à contração induzida pelo mimético do tromboxano U46619 e do log da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50) em anéis de aorta torácica de camundongos controles. n = 6-7 por grupo.

3.3.2 Resposta vasoconstritora em anéis de aorta

A resposta constritora máxima e a sensibilidade ao cloreto de potássio e à serotonina foram semelhantes em anéis de aorta de camundongos controle se obesos (Figura 8A e 8D, Tabela 7). A resposta máxima não foi deferente, mas a sensibilidade ao mimético de tromboxano U46619 foi reduzida em anéis de aorta de camundongos obesos em comparação aos camundongos controles (Figura 8B, Tabela 7). Anéis de aorta de camundongos obesos apresentaram reduzida resposta máxima à noradrenalina (Figura 8C, Tabela 7).

Figura 8 – Curvas concentração-resposta para cloreto de potássio (A), U46619 (B), noradrenalina (C) e serotonina (D) em anéis aorta torácica de camundongos controles e obesos. Cada ponto representa a média $\pm$ e.p.m. da força desenvolvida em resposta ao

agente utilizado. n = 5 (cloreto de potássio), n = 8-9 (U46619), n = 8-9 (noradrenalina) e n = 4-5 (serotonina) por grupo.

Tabela 7 – Resposta máxima (mN) induzida pelos agentes contráteis em anéis de aorta.

	Controle	Obeso
Cloreto de Potássio		
Força (mN)	9,1 ± 1,2	9,7 ± 0,7
Log EC50	42,9 ± 5,7	40,9 ± 2,4
U46619		
Força (mN)	15,5 ± 0,8	14,9 ± 0,4
Log EC50	-8,0 ± 0,2	-7,8 ± 0,2*
Noradrenalina		
Força (mN)	6,8 ± 0,8	1,9 ± 0,2*
Serotonina		
Força (mN)	7,5 ± 0,4	6,4 ± 0,9
Log EC50	-7,2 ± 0,1	-7,3 ± 0,1

Os valores representam a média ± e.p.m. da força máxima desenvolvida por anéis de aorta em resposta aos agentes utilizados. Teste *t-Student*: * $p < 0,05$ versus Controle. n = 5 (cloreto de potássio), n = 8-9 (U46619), n = 8-9 (noradrenalina) e n = 4-5 (serotonina) por grupo.

3.3.3 Modulação da resposta vasoconstritora à noradrenalina pelo óxido nítrico e produtos da cicloxigenase

A incubação de anéis de aorta com L-NAME e com L-NIL aumentou a resposta à noradrenalina no grupo controle e obeso, abolindo a diferença de resposta entre os dois grupos (Figura 9A e 9B, Tabela 8). A resposta à noradrenalina em anéis de aorta de camundongos controles não foi modificada pela incubação com indometacina, porém a resposta à noradrenalina em anéis de camundongos obesos foi aumentada após incubação com indometacina (Figura 9C, Tabela 8).

Figura 9 – Curvas concentração-resposta à noradrenalina na ausência e na presença de L-NAME (A), L-NIL (B) e indometacina (C) em anéis de aorta torácica de camundongos controles e obesos. Cada ponto representa a média $\pm$ e.p.m. da força desenvolvida em resposta ao agonista. $n = 5$ por grupo.

Tabela 8 – Resposta máxima (mN/mm) e sensibilidade (log EC50) à noradrenalina em anéis de aorta torácica incubados com L-NAME, L-NIL e indometacina.

	CONTROLE	OBESO
Noradrenalina		
Força (mN)	6,8 ± 0,7	1,9 ± 0,2*
Log EC50	-8,2 ± 0,2	-8,1 ± 0,1
L-NAME		
Força (mN)	16,2 ± 1,6 [#]	15,7 ± 0,9 [#]
Log EC50	-8,6 ± 0,2	-8,3 ± 0,2
L-NIL		
Força (mN)	13,2 ± 0,7 [#]	11,8 ± 1,1 [#]
Log EC50	-9,0 ± 0,3	-8,8 ± 0,3
Indometacina		
Força (mN)	5,7 ± 1,0	4,3 ± 1,1 [#]
Log EC50	-8,4 ± 0,2	-8,5 ± 0,2

Os valores representam média ± e.p.m. da força máxima desenvolvida e do log da concentração que induz 50% da resposta máxima (EC50) induzida pela noradrenalina em artérias mesentéricas de resistência. ANOVA uma via: * p < 0,05 versus controle; [#] p < 0,05 versus noradrenalina. n = 5 por grupo.

3.4 Expressão do RNAm de marcadores inflamatórios em artérias mesentéricas e aorta

A expressão do RNAm de TNF- α , COX-2 e iNOS foi semelhante nas artérias mesentéricas de camundongos controles e obesos (Figura 10A). No entanto, artérias mesentéricas de camundongos obesos apresentaram aumentada expressão do RNAm de IL-1 β , IL-6 e IL-10 (Figura 10A).

Já aorta de camundongos obesos apresentaram similar expressão de RNAm de IL-6, COX-2 e iNOS ao de aorta de camundongos controles, enquanto que a expressão do RNAm de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foi aumentada (Figura 10B).

Figura 10 – Expressão de RNAm de TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, COX-2 e iNOS em artérias mesentéricas (A) e aorta (B) de camundongos controles e obesos. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. Teste *t*-Student: * $p < 0,05$ versus Controle. $n = 5$.

3.5 Expressão do RNAm de marcadores de fenótipo do músculo liso em artérias mesentéricas e aorta

Artérias mesentéricas de camundongos obesos apresentaram aumento na expressão de RNAm de SM22 α e de Notch3 quando comparadas às artérias de camundongos controles (Figura 11A).

A expressão de RNAm de SM22 α foi aumentada enquanto a expressão de RNAm de Notch3 foi reduzida em aorta de camundongos obesos em relação aos camundongos controles (Figura 11B).

Figura 11 – Expressão de RNAm de SM22 α e Notch3 em artérias mesentéricas (A) e aorta (B) de camundongos controles e obesos. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. Teste *t*-Student onde * $p < 0,05$ versus Controle. $n = 5$.

3.6 Conteúdo de colágeno em artérias mesentéricas e aorta

A porcentagem da área marcada pelo vermelho de Picro Sirius foi maior em cortes de artérias mesentéricas de camundongos obesos do que de camundongos controles (Figura 12A e 12B). Por outro lado, a área marcada foi similar em cortes de aorta de camundongos controles e obesos (Figura 12D e 12 E).

A expressão de RNAm de colágeno 3 foi aumentada em artéria mesentérica (Figura 12C), mas não foi modificada em aorta, de camundongos obesos em comparação ao de camundongos controles (Figura 12F).

Figura 12 – Imagens representativas de cortes corados pela técnica de vermelho de Picro Sirius de artérias mesentéricas (A) e aorta (D) de camundongos controles e obesos. Porcentagem da área corada por vermelho de Picro Sirius em relação à área total de cortes de artérias mesentéricas (B) e de aorta (E) de camundongos controles (C) e obesos (O). Expressão de RNAm de colágeno-3 em artérias mesentéricas (C) e aorta (F) de camundongos controles (C) e obesos (O). Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. Teste *t*-Student: * $p < 0,05$ versus Controle. $n = 5$ por grupo.

3.7 Expressão do RNAm de marcadores de senescência celular em artérias mesentéricas e aorta

A expressão do RNAm de p27 foi aumentada, enquanto a expressão de RNAm de p53 foi similar, em artérias mesentéricas de camundongos obesos quando comparados aos camundongos controles (Figura 13A). Por outro lado, a expressão do RNAm de p27 em aorta não apresentou diferença entre os grupos estudados, mas a expressão do RNAm de p53 foi reduzida em aorta de camundongos obesos em relação aos camundongos controles (Figura 13B).

Figura 13 – Expressão de RNAm de p27 e p53 em artérias mesentéricas (A) e aorta (B) de camundongos controles e obesos. Os valores representam a média $\pm$ e.p.m. Teste *t-Student*: * $p < 0,05$ versus Controle. $n = 5$ por grupo.

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos foram desenvolvidos vários modelos de obesidade. Podemos citar entre eles, os modelos induzidos por dietas ricas em gordura, com grandes variações na duração de indução da obesidade e na porcentagem de gordura e de calorias, bem como modelos genéticos (Fan et al., 2009; Fatani et al., 2007; Fitzgibbons et al., 2011; Gallou-Kabani et al., 2007; Goodwill et al., 2009; Ketonen et al., 2010; Sweazea, Walker, 2012; Tian et al., 2012; Vijay-Kumar et al., 2011).

Modelos experimentais que utilizam dietas ricas em gordura podem mimetizar características observadas em humanos obesos, sendo que camundongos submetidos a um período de 15 semanas de dieta hiperlipídica representam humanos acometidos pela obesidade por cerca de 8 a 10 anos (Bhattacharya et al., 2008). Existem diversos estudos demonstrando uma quantidade cada vez maior de crianças e adolescentes com sobrepeso, e até mesmo obesos (Daniels, 2009). Nosso modelo experimental de obesidade inicia-se em animais jovens, 4 semanas de idade, e as avaliações vasculares foram realizadas 16 semanas após o seu início. Entender as alterações causadas pela obesidade ainda nas fases iniciais da vida sobre o sistema vascular é extremamente importante, uma vez que crianças e adolescentes obesos possuem riscos mais elevados para o desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade no início da fase adulta, comprometendo enormemente a qualidade de vida e elevando ainda mais os gastos com a saúde (Malik et al., 2013; Reilly, Kelly, 2011; Vanhala et al., 1998).

Nosso protocolo foi eficaz em induzir obesidade, uma vez que os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram aumento da massa corpórea, do índice de Lee e dos depósitos de gordura quando comparados aos animais que receberam dieta convencional. Além do mais, a ingestão de ração hiperlipídica por 16 semanas promoveu alterações metabólicas típicas da obesidade como elevação da glicemia e dos níveis séricos de colesterol total. Contudo, tanto a fração colesterol-LDL quanto a fração colesterol-HDL foram elevadas. É sabido que em diversas linhagens de camundongos submetidas à dieta hiperlipídica, há um aumento nos níveis séricos de colesterol total e que esse aumento se deve, em parte, por uma elevação nos níveis séricos da fração colesterol-HDL (Paigen, 1995). O aumento na fração HDL do colesterol em roedores é bem descrito na literatura (Alberti et al., 2005; Gallou-

Kabani et al., 2007), o que pode conferir proteção à formação da placa aterosclerótica. De fato, camundongos C57BL/6 jovens são normalmente resistentes à formação de placa aterosclerótica, mesmo submetidos a dietas ricas em gorduras (Traupe, 2002). Outro aspecto da obesidade é a presença de inflamação sistêmica de baixo grau, que ao lado da dislipidemia é crítica para o desenvolvimento de doenças vasculares. Os animais utilizados no presente estudo apresentaram inflamação sistêmica, já que os níveis séricos de TNF α estavam elevados, o que condiz com o fato de que durante o processo de desenvolvimento da obesidade, os adipócitos passam a liberar citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea (Gaal et al., 2006).

Assim, demonstramos que nosso modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica foi capaz de mimetizar as alterações metabólicas observadas em indivíduos obesos, pelo menos em parte.

A alteração vascular mais comum em doenças metabólicas é a disfunção endotelial (Avogaro, Kreutzenberg, 2005; Steinberg et al., 1996). A redução na biodisponibilidade de NO produzido pela eNOS é uma das características da disfunção endotelial (Tousoulis et al., 2013). Soma-se ainda a este processo, a participação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produtos da ciclooxigenase (Kobayasi et al., 2010; Prieto et al., 2014). O aumento de fatores pró-inflamatórios decorrentes da obesidade tem participação primordial na redução da função endotelial (Alpert et al., 2014; Rocha, Libby, 2009; Sotornik et al., 2012). Em diversos modelos experimentais que mimetizam a obesidade humana, roedores podem apresentar as características observadas em indivíduos obesos, como a disfunção endotelial (Gallou-Kabani et al., 2007). Nosso modelo experimental não apresentou disfunção endotelial tanto em anéis de artérias mesentéricas de resistência quanto em anéis de aorta, porque as respostas à acetilcolina e ao doador de NO foram semelhantes nos camundongos controles e obesos, apesar das alterações metabólicas e da inflamação sistêmica.

Diferentemente da função endotelial, o músculo liso vascular foi mais comprometido pela obesidade. Nas artérias mesentéricas de resistência de camundongos obesos, observamos redução da contração induzida por diversos agentes. Por outro lado, em anéis de aorta de camundongos obesos foi observado apenas redução na capacidade contrátil à noradrenalina. Esses resultados mostram que cada leito vascular adapta-se diferentemente a alterações metabólicas.

Como a reatividade vascular foi avaliada em anéis de aorta e de artérias mesentéricas de resistência com endotélio íntegro e os fatores endoteliais relaxantes modulam negativamente a resposta contrátil, fomos investigar se haveria maior participação do NO e dos produtos da COX na modulação da resposta à noradrenalina nos camundongos obesos, que poderia ser responsável, pelo menos em parte, pela resposta contrátil reduzida.

A avaliação da participação do NO através da incubação com L-NAME, demonstrou que a produção de NO não está relacionada com a redução da resposta contrátil das artérias mesentéricas de resistência de camundongos obesos. Por outro lado, o mesmo bloqueio em anéis de aorta revelou maior modulação da resposta contrátil pelo NO em camundongos obesos, porque a contração foi aumentada e a diferença de resposta à noradrenalina entre os dois grupos foi abolida na presença de L-NAME.

Além do NO sintetizado pela NOS endotelial, NO sintetizado por outras isoformas também pode modular a resposta contrátil. Em animais diabéticos, a redução da resposta pressora (Nagareddy et al., 2005) e da contração (Sartoretto, 2014) induzidas pela noradrenalina foram restauradas pela inibição da iNOS. Adipocinas liberadas pelo tecido adiposo durante o desenvolvimento da obesidade poderiam levar a maior expressão da iNOS na parede vascular (Climent et al., 2014). Dessa maneira, avaliamos se a inibição da iNOS poderia corrigir a reduzida resposta contrátil também em artérias de camundongos obesos.

L-NIL é um inibidor potente e relativamente seletivo da iNOS (CE50 de 5,9 μ M para iNOS comparado a CE50 de 138 μ M para eNOS e 35 μ M para nNOS) (Hallinan et al., 2002), porém no presente estudo seu efeito parece não ter sido seletivo. A incubação com L-NIL aumentou a contração à noradrenalina apenas em anéis de artérias mesentéricas de resistência de camundongos controles e, em anéis de aorta dos animais controles e obesos, aumentou essa resposta na mesma proporção que o L-NAME. Apesar de não ter sido possível avaliar a participação da isoforma iNOS na resposta contrátil de camundongos obesos, a expressão do RNAm para iNOS em artérias mesentéricas de resistência e aorta foi semelhante em camundongos controles e obesos, o que indica que a reduzida resposta contrátil em camundongos obesos possa não estar relacionada com esta isoforma.

Não houve alteração na resposta contrátil em artérias mesentéricas de resistência incubadas com indometacina, excluindo dessa maneira uma provável

participação dos produtos da COX na reduzida resposta contrátil em animais obesos. Por outro lado, em anéis de aorta de camundongos obesos, mas não de camundongos controles, incubados com indometacina, foi observado aumento na contração à noradrenalina, sugerindo que não só maior modulação pelo NO, mas também uma participação de prostanoides vasodilatadores participam da redução da resposta à noradrenalina.

Em conjunto, nossos resultados sugerem que em artérias mesentéricas de resistência de camundongos obesos a redução da resposta contrátil é global e se deve a alterações no músculo liso, enquanto na aorta a alteração é específica para agonista adrenérgico e se deve a maior modulação negativa pelo NO e produtos da COX.

Um ponto importante que deve ser considerado é que outros parâmetros não avaliados no presente estudo possam também ter um papel na redução da contratilidade observada. Um desses parâmetros seria a resposta do músculo liso frente à hiperpolarização. Diversos moduladores químicos podem promover essa hiperpolarização, por exemplo, H_2S , CO, espécies reativas de oxigênio (H_2O_2), peptídeos e metabólitos do ácido araquidônico derivados da COX, das lipoxigenases e do citocromo P450. Essa hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} , seja pela redução da probabilidade de abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, ou por canais de cálcio dependentes de ativação pelo retículo sarcoplasmático, sendo essa uma maneira de levar ao relaxamento do músculo liso vascular (Félétou, Vanhoutte, 2009).

Aumento na liberação de fatores pró-inflamatórios oriundos do tecido adiposo visceral ou do PVAT pode levar a alterações das células da vasculatura (Szasz, Webb, 2012.). Além disso, a obesidade induz inflamação local na parede vascular, já que aorta de camundongos fêmeas obesas apresentou aumento da expressão proteica de $TNF-\alpha$ e da ativação do fator nuclear- κB (NF- κB) (Kobayasi et al., 2010).

Na vasculatura, citocinas pró-inflamatórias levam a alterações da função endotelial, a mudanças no fenótipo celular, alterando a composição da matriz extracelular, e à senescência celular (Wang et al., 2009). No presente estudo, mostramos que RNAm de genes inflamatórios estão aumentados em artérias mesentéricas e aorta de camundongos obesos. Entretanto, esse perfil pró-inflamatório pode estar sendo contrabalanceado, pois observamos aumento também do RNAm para a citocina anti-inflamatória IL-10.

As CMLVs respondem a diferentes estímulos mudando seu fenótipo. Mediadores inflamatórios podem induzir mudança no padrão da expressão de genes, estimulando as CMLVs a passarem do fenótipo contrátil para o fenótipo sintético. Marcadores desses dois fenótipos foram avaliados no presente estudo. SM22 α é expresso por células musculares com fenótipo contrátil e a redução da sua expressão está relacionada com o estado inflamatório das células musculares lisas. Já o Notch3 é expresso em células com fenótipo sintético e é uma proteína transmembrana presente entre as células endoteliais e musculares lisas, possui um papel importante nas respostas celulares frente a alterações na matriz extracelular e diferenciação celular. No presente estudo, observamos que a expressão do RNAm para SM22 α foi aumentada nos dois leitos estudados, mas o RNAm para Notch 3 foi aumentado em artérias mesentéricas e reduzido em aorta de camundongos obesos. Nossos resultados indicam, portanto, que existem células musculares com fenótipo contrátil e sintético em artérias mesentéricas de camundongos obesos, já o fenótipo contrátil é predominante em aorta. A mudança do fenótipo das CMLVs poderia explicar a redução da capacidade contrátil global das artérias mesentéricas dos camundongos obesos. O aumento do depósito de colágeno e maior expressão do RNAm para o colágeno 3 reforçam a ideia de que houve mudança para um fenótipo sintético das células musculares das artérias mesentéricas. A mudança para um fenótipo sintético das CMLVs altera os componentes da matriz extracelular e promove remodelamento vascular, mas a estrutura vascular não foi avaliada no presente estudo.

Outra mudança fenotípica das células vasculares que poderia ocorrer na obesidade é a senescência celular. O processo de envelhecimento induz modulação fenotípica das células vasculares, que se caracteriza pelo fenótipo sintético das CMLVs, aumentada síntese de matriz extracelular, perfil pró-inflamatório e senescência celular. Essa mudança fenotípica ocorre gradativamente durante o processo de envelhecimento, mas pode ser acelerada por algumas condições, como a obesidade, porque citocinas pró-inflamatórias medeiam, pelo menos em parte, essa mudança. Wang e colaboradores (2009) observaram que células endoteliais de aorta de camundongos obesos apresentaram um aumento no número de células senescentes comparado aos animais controles através da atividade da β -galactosidade, o que levou à redução da capacidade regenerativa das células endoteliais.

O fenótipo senescente é caracterizado por redução das CMLVs na camada média, redução da capacidade proliferativa e aumento de marcadores de senescência celular (Liu et al., 2011). Porque a senescência celular é um processo irreversível e reduz a plasticidade e a capacidade de reprogramação das CMLVs para retornar ao fenótipo contrátil, acúmulo de células senescentes na camada média poderia levar ao declínio do potencial contrátil, culminando por sua vez, em disfunção vascular (Minamino, Komuro, 2007). Aumentada proliferação celular e aumento dos fatores de supressão tumoral, p53, p21 e p27, podem estar associados à senescência celular (Fyhrquist et al., 2013; Van Deursen, 2014; Wang et al., 2009). No presente estudo, a expressão de RNAm de supressores tumorais estava reduzido tanto em artérias mesentéricas quanto em aorta de camundongos obesos, o que descaracteriza um fenótipo senescente

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que:

- 1) dieta hiperlipídica por 16 semanas induz obesidade, alterações metabólicas e inflamação sistêmica;
- 2) a função endotelial de camundongos obesos está protegida das alterações metabólicas e inflamação, possivelmente por aumento da citocina anti-inflamatória IL-10;
- 3) artérias mesentéricas de camundongos obesos apresentam redução da capacidade contrátil global, que pode ser decorrente da presença de CMLVs com fenótipo sintético;
- 4) aorta de camundongos obesos apresenta redução específica da resposta contrátil induzida pela noradrenalina, que é decorrente da maior modulação negativa pelo NO e prostanoídes vasodilatadores.

REFERÊNCIAS*

- Abate N. Insulin resistance and obesity. The role of fat distribution pattern. *Diabetes Care*. 1996;19:292-4.
- Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100:158–73.
- Alam I, Ng TP, Larbi A. Does inflammation determine whether obesity is metabolically healthy or unhealthy? The aging perspective. *Mediators of Inflammation*. 2012;456456.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059–62.
- Allison DB, Downey M, Atkinson RL et al. Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obesity* (Silver Spring, Md.). 2008;16:1161–77.
- Alpert MA, Lavie CJ, Agrawal H, Aggarwal KB & Kumar SA. Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Transl Res*. 2014;S1931-5244(14):00134-0.
- Alva JA, Iruela-Arispe ML. Notch signaling in vascular morphogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2004 Jul;11(4):278-83.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999; 284(5415):770-6.
- Aviv A. Chronology versus biology: telomeres, essential hypertension, and vascular aging. *Hypertension*. 2002;40:229–32.
- Avogaro A, Kreutzenberg S. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clinica Chimica Acta*. 2005;360:926.
- Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signalling system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993(90):347–51.
- Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol*. 1998;84:1311-1315.
- Bahrami H, Bluemke DA, Kronmal R, et al. Novel metabolic risk factors for incident heart failure and their relationship with obesity: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1775–83.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14(2):113-9.

Baron M, Aslam H, Flasz M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, Wilkin MB. Multiple levels of Notch signal regulation (review). *Mol Membr Biol.* 2002;19(1):27-38.

Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014;56:369–81.

Bhattacharya I, Mundy A, Widmer C, Kretz M, Barton M. Regional heterogeneity of functional changes in conduit arteries after high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.).* 2008;16:743–8.

Begg DP, Woods SC. The endocrinology of food intake. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:584–97.

Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96:939–49.

Bernard D, Gosselin K, Monte D, et al. Involvement of Rel/nuclear factor-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence. *Cancer Res.* 2004;64:472–81.

Bohm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2007;76:818.

Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 1998;83:1271–8.

Brasil. Ministério da Saúde. 2014. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=12453&catid=11&Itemid=103. Acesso em: 12 ago. 2014.

Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):678-89.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175–95.

Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Rad Res.* 1999;31: 577–96.

Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell.* 1996;84:497–500.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005;120:513–22.

Campos AH, Wang W, Pollman MJ, Gibbons GH. Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation. *Circ Res*. 2002;91(11):999-1006.

Climent B, Simonsen U, Rivera L. Effects of obesity on vascular potassium channels. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12:438–52.

Daniels S. Complications of obesity in children and adolescents. *Int J Obes. (Lond.)*. 2009;33Suppl1:S60-5.

Donato AJ, Black AD, Jablonski KL, Gano LB, Seals DR. Aging is associated with greater nuclear NF kappa B, reduced I kappa B alpha, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. *Aging Cell*. 2008;7:805–12.

Erusalimsky JD. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol*. 1985;106:326–32.

Fan LH, Tian HY, Yang ML et al. High-fat diet may impair KATP channels in vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother*. 2009;63(2):165-70.

Fatani S, Pickavance LC, Sadler CJ et al. Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study. *Nutr Metab. (Lond)*. 2007;14:4:15.

Febbraio M. Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(6):312-9.

Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci. (Lond.)*. 2009;117:139–55.

Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M et al. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1425–37.

Fischer C, Schneider M, Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. In: Moncada S, Higgs A, editors. *Handbook of pharmacology: the vascular endothelium II*. 2006. p. 157–212.

Furukawa A, Tada-Oikawa S, Kawanishi S, Oikawa S. H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20:45–54.

Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:274–83.

Gaal L, Mertens I, Block C. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444:875–80.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS, et al. C57BL/6J and A/J Mice Fed a High-Fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(8):1996-2005.

Ghibaudo L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity Res*. 2002;10:956-63.

Goodwill AG, Frisbee SJ, Stapleton, et al. Impact of chronic anticholesterol therapy on development of microvascular rarefaction in the metabolic syndrome. *Microcirculation*. 2009;16(8):667-84.

Gu P, Xu A. Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14:49-58.

Hallinan EA, Tsymbalov S, Dorn CR et al. Synthesis and biological characterization of L-N(6)-(1-iminoethyl)lysine 5-tetrazole-amide, a prodrug of a selective iNOS inhibitor. *J Med Chem*. 2002;45(8):1686-9.

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 1987;235: 473-6.

Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012;126: 126-32.

Hofmann B, Yakobus Y, Indrasari M, et al. RAGE influences the development of aortic valve stenosis in mice on a high fat diet. *Exp Gerontol*. 2014;10:S0531-5565.

Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):543-53.

Janssen I, Katzmarzyk P, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:379-84.

Joutel A, Andreux F, Gaulis S, et al. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest*. 2000;105:597-605.

Kalebic T, Garbisa S, Glaser B. Basement membrane collagen degradation by migrating endothelial cells. *Science*. 1983;221: 281-4.

Kawai-Kowase K, Owens G. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;292: C59-C69.

Ketonen J, Shi J, Martonen et al. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J*. 2010;74(7):1479-87.

Kim, HJ, Higashimori T, Park SY, et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 2004;53:1060–7.

Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2003;52:2784–9.

Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, et al. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens*. 2010;28:2111–9.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635–43.

Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, et al. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 2012;95:194–204.

Lee M, Wang Y, Vanhoutte P. Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NFkB. *J Vasc Res*. 2010;47:287–98.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–84.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233–41.

Malik V, Willett W, Hu F. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nature reviews. Endocrinology*. 2013;9:13–27.

Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol*. 2012;165:643–58.

Michas G, Micha R, Zampelas A. Dietary fats and cardiovascular disease: putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):320–8.

Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence contribution to atherosclerosis. *Circ. Res*. 2007;100:15–26.

Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, et al. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J*. 2004;23: 212–220.

Morrow D, Sweeney C, Birney YA, Cummins PM, Walls D, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic strain inhibits Notch receptor signaling in vascular smooth muscle cells in vitro. *Circ Res*. 2005;96(5):567–75.

Morrow D, Guha S, Sweeney C, et al. Notch and vascular smooth muscle cell phenotype. *Circ Res*. 2008;5:1370–82.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977;41(1):19–26.

Mundy A, Haas E, Bhattacharya I, et al. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res*. 2007;73: 368-375.

Noronha BT, Li JMM, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes*. 2005;54:1082–9.

Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;304(7):R543-52.

Paigen B. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. *Am J Clin Nutr*. 1995;62:458–62S.

Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43:509–20.

Petro AE, Cotter J, Cooper DA, et al. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism*. 2004;53:454–7.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

Pierce G, Lesniewski L, Lawson B, Beske S, Seals D. Nuclear factor-kappaB activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation*. 2009;119:1284–92.

Prieto D, Contreras C, Sanchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12:412–26.

Proweller A, Pear WS, Parmacek MS. Notch signaling represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem*. 2005;280:8994–9004.

Reinehr T. Lifestyle intervention in childhood obesity: changes and challenges. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:607–14.

Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *Int J Obes. (Lond)*. 2011;35:891–8.

Rippe J, Crossley S, Ringer R. Obesity as a chronic disease: modern medical and lifestyle management. *J Am Diet Assoc*. 1998;98:S9–S15.

Rizzoni D, De Cluceis C, Porteri E, et al. Structural alterations in small resistance arteries in obesity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(1):56-62.

Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, et al. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*. 2006;55:928-34.

Rocha V, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:399–409.

Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20.

Sachidanandam K, Hutchinson JR, Elgebaly MM et al. Differential effects of diet-induced dyslipidemia and hyperglycemia on mesenteric resistance artery structure and function in type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328:123–30.

Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O. Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr. Diabetes*. 2012;30;2: e37.

Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci*. 1995;57:2049–55.

Shen J, Yang M, Ju D, et al. Disruption of SM22 promotes inflammation after artery injury via nuclear factor kappaB activation. *Circ Res*. 2010;106:1351-62

Smith W, Garavito R, DeWitt D. Prostaglandin endoperoxide H synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 1996;271:33157–160.

Sobue K, Hayashi K, Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol Cell Biochem*. 1999;190(1-2):105-18.

Sotornik R, Brassard P, Martin E, Yale P, et al. Update on adipose tissue blood flow regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(10):E1157-70.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, et al. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97:2601–10.

Stuehr DJ, Marletta MA. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res*. 1987;47:5590–5.

Sweazea KL, Walker BR. Impaired myogenic tone in mesenteric arteries from overweight rats. *Nutr Metab. (Lond)*. 2012;9(1):18.

Sweeney C, Morrow D, Birney YA, et al. Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J*. 2004;18:1421–3.

Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122:1–12.

Szasz T, Bomfim GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:105–16.

Thalmann S, Meier CA. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res*. 2007;75: 690–701.

Tian X, Wong WT, Xu A, et al. Uncoupling protein-2 protects endothelial function in diet-induced obese mice. *Circ Res*. 2012;110:1211–6.

Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther*. 2014;11:S0163-7258.

Traupe T, D'Uscio LV, Muentner K, et al. Effects of obesity on endothelium-dependent reactivity during acute nitric oxide synthase inhibition: modulatory role of endothelin. *Clin Sci (Lond.)*. 2002;103:Suppl 48:13S–15S.

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002;415: 45–53.

Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, et al. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66:866–75.

van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192:1731–44.

van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509:439–46.

Vanhala M, Vanhala P, Kumpusalo E, Halonen P, Takala, J. Relation between obesity from childhood to adulthood and the metabolic syndrome: population based study. *BMJ*. 1998;317(7154):319.

Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. *Exper Physiol*. 2009; 94:317–21.

Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA et al. Loss of function mutation in toll-like receptor-4 does not offer protection against obesity and insulin resistance induced by a diet high in trans fat in mice. *J Inflamm (Lond)*. 2011;11:8(1):2.

Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev*. 2001;108(1-2):161-4.

Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism*. 2013;62:1513–21.

Wang T, Baron M, Trump D. An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;96:499–509.

Wang W, Chen JX, Liao R et al. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3389–403.

Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, et al. Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. *Sci Signal.* 2009;2(62):ra11.

Weissberg PL, Cary NR, Shanahan CM. Gene expression and vascular smooth muscle cell phenotype. *Blood Press Suppl.* 1995;2:68-73

Wimalasundera R, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD. Effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. *Br J Pharmacol.* 2003;138:1285–94.

World Health Organization. The challenge of obesity in the WHO European Region. Copenhagen, Bucharest, 12 September, 2005.

Yan ZQ, Sirsjö A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hansson GK. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19: 2854–62.

Zdanov S, Bernard D, Debacq-Chainiaux F, et al. Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Exp. Cell Res.* 2007; 313:3046–56.