



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-graduação em Farmacologia



VICTOR OLIVEIRA ASSIS

Efeitos pleiotrópicos do nebivolol sobre a disfunção vascular e mecanismos inflamatórios do tecido adiposo perivascular na hipertensão secundária à obesidade

Ribeirão Preto

2023

VICTOR OLIVEIRA ASSIS

Efeitos pleiotrópicos do nebivolol sobre a disfunção vascular e mecanismos inflamatórios do tecido adiposo perivascular na hipertensão secundária à obesidade

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

ASSIS, VICTOR OLIVEIRA

Efeitos pleiotrópicos do nebivolol sobre a disfunção vascular e mecanismos inflamatórios do tecido adiposo perivascular na hipertensão secundária à obesidade. Ribeirão Preto, 2023.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Carlos Renato Tirapelli

1.Nebivolol. 2. Obesidade 3. Hipertensão. 4. PVAT. 5. Estresse oxidativo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Candidato: Victor Oliveira Assis

Título da Dissertação: Efeitos pleiotrópicos do nebivolol sobre a disfunção vascular e mecanismos inflamatórios do tecido adiposo perivascular na hipertensão secundária à obesidade.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

A Comissão Julgadora do trabalho de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 26/09/2023, considerou o candidato:

(X) Aprovado

() Reprovado

Examinador(a):

Assinatura:

Nome: Luciana Venturini Rossoni

Instituição: ICB-USP

Examinador(a):

Assinatura:

Nome: Jamaira Aparecida Victorio

Instituição: UFSC

Presidente:

Assinatura:

Nome: Carlos Renato Tirapelli

Instituição: EERP-USP

Dedico este trabalho a todos os que defendem
o sistema público de ensino.

Agradecimentos

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

É com imensa gratidão que dedico os primeiros compassos deste agradecimento à minha família. O apoio que vocês me proporcionaram ao longo desta jornada são a base sólida sobre a qual pude construir meus sonhos acadêmicos. As palavras jamais serão suficientes para expressar o quanto sou grato por cada suporte e celebração compartilhados. Aos meus pais, Luciley e Adeferson, que aprenderam a lidar com minha mudança em 2017 pra cursar Química em Ribeirão Preto e me ajudaram a me estabelecer em outro estado até este momento que finalizo meu mestrado. À minha irmã, Vivian, pelas atualizações quase que diárias sobre toda a família e assim a distância de casa diminuía.

Também agradeço às minhas avós, Erli e Matilde, às minhas madrinhas, tia Lada e tia Peta, aos primos, tios e toda a família que tornaram meus retornos à Coronel Fabriciano (MG) em festa. Sem o apoio e a confiança que vocês depositaram em mim, este marco não seria possível.

Aos amigos que a Química USP-RP me trouxe. Adrinê/Penny, Alexandre/Carneiro, Ana Laura/Gretchen, João Manoel/Martin, Luiz/Indi Marina/Sinopse, Nicolas/Matiza e Vitor/Godo, sem sombra de dúvidas vocês mudaram completamente a minha experiência em Ribeirão Preto. Vocês estiveram comigo em todos os momentos dentro e fora da Universidade e a participação de vocês na minha vida foi essencial pro meu progresso pessoal e profissional.

Aos que melhoram meu dia a cada vez que encontro, Beatriz, Camila/Magda, Duda/Favorável, Flávia/Tranquilo, Gabriel/Verdadeiro, Guilherme/Mestre, Lucas/Bozo, Luiza/Chica, vocês são incríveis! Cada encontro foi um evento e sou muito grato em criar essas memórias com vocês.

Ao *Petit comité* que se tornou mais do que um grupo de corrida, mas uma rede de trocas de experiências e suporte mútuo.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pelo companheirismo durante todos esses anos. À Natália, por ter me recebido tão bem e me ensinado detalhadamente como conduzir um projeto de pesquisa. À Wanessa, por trazer a leveza ao ambiente de trabalho e deixar nossos dias mais tranquilos. Ao Arthur, pelo companheirismo desde a IC. Ao Gustavo, pelas descontrações que melhoram o humor de qualquer pessoa. Ao Thales, pelas discussões super ricas que agregaram ao trabalho. Ao Ivis, pelas risadas e aos ICs, Leonardo e Yasmin, pela ajuda.

Àquele que me orientou com maestria, prof. Dr. Carlos Tirapelli, sou imensamente grato. Sua orientação paciente, expertise e comprometimento foram essenciais para a condução não somente deste estudo, mas de toda a nossa parceria que se iniciou em 2018. Suas sugestões perspicazes e conselhos valiosos moldaram este trabalho e aprimoraram minha capacidade de compreender e contribuir para a pesquisa.

Quero expressar meu sincero apreço aos colaboradores deste estudo. Sua disposição em compartilhar suas experiências e conhecimentos contribuiu diretamente para a realização desta pesquisa.

Por último, mas certamente não menos importante, desejo estender minha gratidão a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, tiveram um impacto positivo em minha trajetória.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Com o coração cheio de gratidão, reconheço a importância de cada pessoa que fez parte desta jornada. Que a lembrança deste momento permaneça conosco como uma celebração da força da união e do poder da perseverança.

Com profundo agradecimento,

Victor/Tolá

*“O correr da vida embrulha tudo,
a vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem”*

João Guimarães Rosa

Resumo

ASSIS, V. O. Efeitos pleiotrópicos do nebivolol sobre a disfunção vascular e mecanismos inflamatórios do tecido adiposo perivascular na hipertensão secundária à obesidade. 2023. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A obesidade é uma doença crônica que induz danos em diferentes órgãos e sistemas, podendo figurar como importante fator de risco no desenvolvimento de complicações cardiovasculares. Dentre os tecidos afetados pela obesidade, tem-se o tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* - PVAT), sendo esse capaz de modular a resposta vascular via secreção de substâncias vasodilatadoras. Na obesidade, há aumento da quantidade e modificação estrutural do PVAT ao longo da vasculatura. Essas alterações incluem aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) via NADPH oxidase, redução da capacidade antioxidante e subsequente redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), uma das espécies mediadoras da ação anti-contrátil do PVAT. Dessa forma, o PVAT figura como potencial alvo de interesse no entendimento das alterações vasculares induzidas pela obesidade. O controle da hipertensão associada à obesidade deve levar em consideração marcadores da síndrome metabólica, sendo os β -bloqueadores uma opção terapêutica. Dentre eles, o nebivolol se destaca pelo seu perfil onde, além da ação antagonista sobre os receptores β_1 -adrenérgicos, também possui efeitos pleiotrópicos antioxidantes associados ao efeito agonista sobre os receptores β_3 -adrenérgicos. Investigamos se o nebivolol restauraria o efeito anti-contrátil do PVAT mesentérico na obesidade. Ratos *Wistar Hannover* foram tratados por 10 semanas com dieta hipercalórica, e em seguida foi realizado tratamento com nebivolol (10 mg/kg/dia, v.o., gavagem) durante 4 semanas. O consumo de dieta hipercalórica promoveu aumento da pressão arterial sistólica e o tratamento com nebivolol reverteu essa resposta. Observamos a perda do efeito anti-contrátil do PVAT mesentérico em resposta à obesidade, resultando em hipercontratilidade vascular. Além disso, foram coletados o PVAT mesentérico e leito arterial mesentérico (LAM) para estudos bioquímicos, onde observamos que a obesidade levou a aumento na produção de ERO e desequilíbrio na atividade antioxidante, respostas essas revertidas após o tratamento com o nebivolol, sugerindo um efeito benéfico sobre os sistemas antioxidantes. Também observamos que a obesidade comprometeu a via nitrérgica, levando à disfunção endotelial e desequilíbrio entre fatores vasoconstritores e vasodilatadores, no entanto o tratamento com nebivolol melhorou a resposta vasodilatadora mediada pelo NO. Por fim, nosso estudo revelou a

influência dos neutrófilos na inflamação do PVAT associada à obesidade. O aumento do recrutamento de neutrófilos na obesidade intensifica a resposta inflamatória no tecido adiposo. Além disso, a presença de macrófagos desempenha um papel central na inflamação do PVAT durante a obesidade, sendo observado um aumento na infiltração de macrófagos pró-inflamatórios. Notavelmente, o tratamento com nebivolol reverteu esse aumento, indicando um efeito modulador na resposta inflamatória. Concluímos que a obesidade induz a disfunção vascular, inflamação e alterações oxidativas no PVAT mesentérico e no LAM. O tratamento com nebivolol exerceu efeitos benéficos, restaurando a função anti-contrátil do PVAT, melhorando a atividade antioxidante e reduzindo a inflamação. Esses resultados destacam o potencial terapêutico do nebivolol no manejo das complicações cardiovasculares associadas à obesidade, através de ações multifatoriais que envolvem modulação do estresse oxidativo, inflamação e regulação do tônus vascular.

Palavras-chave: Nebivolol, Obesidade, Hipertensão, PVAT, Estresse oxidativo.

Abstract

ASSIS, V. O. Pleiotropic Effects of Nebivolol on Vascular Dysfunction and Inflammatory Mechanisms of Perivascular Adipose Tissue in Hypertension Secondary to Obesity. 2023. Master's Dissertation – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Obesity is a chronic disease that induces damage in various organs and systems, potentially serving as a significant risk factor in the development of cardiovascular complications. Among the tissues affected by obesity is the perivascular adipose tissue (PVAT), which is capable of modulating vascular response through the secretion of vasodilatory substances. In obesity, there is an increase in the quantity and structural modification of PVAT along the vasculature. These alterations include an increase in reactive oxygen species (ROS) via NADPH oxidase, reduction in antioxidant capacity, and subsequent decrease in nitric oxide (NO) bioavailability – one of the mediators of PVAT's anti-contractile action. Therefore, PVAT emerges as a potential target of interest in understanding obesity-induced vascular changes. The control of obesity-associated hypertension must consider markers of metabolic syndrome, with β -blockers being a therapeutic option. Among them, nebivolol stands out due to its profile where, in addition to its antagonistic action on β 1-adrenergic receptors, it also has pleiotropic antioxidant effects associated with its agonist effect on β 3-adrenergic receptors. We investigated whether nebivolol would restore the anti-contractile effect of mesenteric PVAT in obesity. Wistar Hannover rats were treated for 10 weeks with a hypercaloric diet, followed by 4 weeks of nebivolol treatment (10 mg/kg/day, oral gavage). Hypercaloric diet consumption led to an increase in systolic blood pressure, and nebivolol treatment reversed this response. We observed the loss of the anti-contractile effect of mesenteric PVAT in response to obesity, resulting in vascular hypercontractility. Furthermore, mesenteric PVAT and mesenteric arterial bed (MAB) were collected for biochemical studies, where obesity led to increased ROS production and antioxidant activity imbalance, responses reversed after nebivolol treatment, suggesting a beneficial effect on antioxidant systems. We also noted that obesity compromised the nitrenergic pathway, leading to endothelial dysfunction and an imbalance between vasoconstrictor and vasodilator factors; however, nebivolol treatment improved the NO-mediated vasodilatory response. Ultimately, our study revealed the influence of neutrophils on PVAT inflammation associated with obesity. The increased recruitment of neutrophils in obesity intensifies the inflammatory response in adipose tissue. Additionally, the presence

of macrophages plays a central role in PVAT inflammation during obesity, with an increase in pro-inflammatory macrophage infiltration observed. Importantly, nebivolol treatment reversed this increase, indicating a modulatory effect on the inflammatory response. In conclusion, obesity induces vascular dysfunction, inflammation, and oxidative alterations in mesenteric PVAT and MAB. Nebivolol treatment exerted beneficial effects, restoring PVAT's anti-contractile function, enhancing antioxidant activity, and reducing inflammation. These findings underscore the therapeutic potential of nebivolol in managing cardiovascular complications associated with obesity, through multifactorial actions involving oxidative stress modulation, inflammation, and vascular tone regulation.

Keywords: Nebivolol, Obesity, Hypertension, PVAT, Oxidative stress.

Lista de figuras

Figura 1. Resumo das principais diferenças fisiológicas entre tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT)	20
Figura 2. Diferenças anatômicas e morfológicas dos PVATs	21
Figura 3. Mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial induzida pela obesidade	24
Figura 4. Mecanismos distintos de cada isômero do nebivolol	25
Figura 5. Modelo experimental	31
Figura 6. Avaliação do consumo de ração e líquido	38
Figura 7. Evolução do massa corporal, ganho de massa total e eficiência alimentar dos animais mantidos sob dieta padrão e hipercalórica	39
Figura 8. Efeito da dieta hipercalórica sobre os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal, mesentérico e o índice de adiposidade	40
Figura 9. Efeito da obesidade sobre a PAS, frequência cardíaca e correlação entre massa corpórea e pressão arterial sistólica	41
Figura 10. Avaliação do perfil lipídico dos animais	42
Figura 11. Efeito da obesidade sobre os níveis plasmáticos de glicemia, sódio, potássio e creatinina	43
Figura 12. Efeito da obesidade e nebivolol na contração vascular induzida por KCl em artérias mesentéricas com [PVAT(+)] e sem [PVAT(-)] PVAT	44
Figura 13. Efeito da obesidade e nebivolol na contração induzida pela fenilefrina em artérias mesentéricas sem [PVAT(-)] e com [PVAT(+)] PVAT	45
Figura 14. Efeito da obesidade e nebivolol na contração induzida pela fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos sem [PVAT(-)] e com [PVAT(+)] PVAT na presença do tiron (1 mmol/L) e a produção de $O_2^{\cdot-}$ no PVAT e LAM	48
Figura 15. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a atividade da SOD no PVAT e LAM	50
Figura 16. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre os níveis de H_2O_2 em PVAT e LAM	51
Figura 17. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a atividade da catalase no PVAT e LAM	52
Figura 18. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre os níveis de MDA em PVAT, LAM e plasma	53

Figura 19. Efeito da obesidade e nebivolol na contração induzida pela fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos sem [PVAT (-)] e com [PVAT (+)] PVAT na presença do L-NAME (100 µmol/L).....	55
Figura 20. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre os níveis de NO ₂ ⁻ em PVAT, LAM e plasma.....	57
Figura 21. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a atividade da MPO e NAG no PVAT e LAM.....	59
Figura 22. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a população de macrófagos no PVAT	60
Figura 23. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a expressão de TNF-α em macrófagos do PVAT.....	61
Figura 24. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a população de macrófagos no LAM	62
Figura 25. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a expressão de TNF-α em macrófagos do LAM	63
Figura 26. Proposta de mecanismo do efeito protetor do nebivolol em relação aos efeitos vasculares deletérios associados à obesidade	75

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores de E_{max} (mN/mm) e pD_2 para fenilefrina em artérias mesentéricas na ausência [PVAT (-)] e presença [PVAT (+)] do PVAT.	46
Tabela 2. Valores de E_{max} (mN/mm) e pD_2 para fenilefrina em artérias mesentéricas na ausência [PVAT (-)] e presença [PVAT (+)] do PVAT na presença do Tiron.	49
Tabela 3. Valores de E_{max} (mN/mm) e pD_2 para fenilefrina em artérias mesentéricas na ausência [PVAT (-)] e presença [PVAT (+)] do PVAT na presença do L-NAME.....	56

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. RISCO CARDIOVASCULAR ASSOCIADO À OBESIDADE	18
1.2. DISFUNÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR	19
1.3. HIPERTENSÃO ARTERIAL SECUNDÁRIA À OBESIDADE	22
1.4. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO PACIENTE OBESO E HIPERTENSO.....	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVO.....	28
3.1. OBJETIVO GERAL.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. MÉTODOS.....	29
4.1. ANIMAIS:.....	29
4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS:	29
4.3. PERFIL NUTRICIONAL, METABÓLICO E ENDÓCRINO:.....	31
4.4. AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA:.....	31
4.5. ESTUDO FUNCIONAL DA REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIA MESENTÉRICA:	32
4.5.1. Normalização	32
4.5.2. Protocolo experimental.....	33
4.6. DETERMINAÇÃO DO BALANÇO REDOX NO PVAT E LAM:	33
4.6.1. Determinação da geração de O_2^*	33
4.6.2. Determinação da atividade da SOD:	34
4.6.3. Avaliação da concentração de H_2O_2 :	34
4.6.4. Determinação da atividade da catalase:	34
4.6.5. Determinação da concentração de malonaldeído (MDA):.....	35
4.7. AVALIAÇÃO DA VIA NITRÉRGICA NO PVAT E LAM:	35
4.7.1 Determinação da concentração de nitrito (NO_2^-):.....	35
4.8. AVALIAÇÃO INFLAMAÇÃO NO PVAT E LAM:	35
4.8.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO):	35
4.8.2. Determinação da atividade da N-acetilglucosaminidase (NAG):	36
4.8.3. Citometria de fluxo.....	37
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADOS	38
5.1. PERFIL NUTRICIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERCALÓRICA	38
5.1.1. Avaliação do consumo de ração e líquido	38
5.1.2. Evolução da massa e ganho de massa total.....	39

5.1.3. Avaliação da hipertrofia de tecidos adiposos e índice de adiposidade	40
5.1.4. Evolução da PAS e frequência cardíaca	41
5.1.5. Avaliação do perfil lipídico	42
5.1.6. Avaliação do perfil glicêmico e função renal	43
5.2. ESTUDO FUNCIONAL DA REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS.....	44
5.2.1. Efeito da obesidade sobre a contração vascular induzida pelo KCl	44
5.2.2. Efeito da obesidade sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina.....	45
5.2.3. Papel das ERO na disfunção vascular em artérias mesentéricas.....	47
5.2.3.1. Determinação da atividade total da SOD	50
5.2.3.2. Determinação dos níveis de H ₂ O ₂	51
5.2.3.3. Determinação da atividade da catalase.....	52
5.2.3.4. Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)	53
5.2.4. Envolvimento da via nitrérgica no efeito da obesidade em artérias mesentéricas.....	54
5.2.4.1. Dosagem de NO ₂ ⁻	57
5.3. AVALIAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS PVAT E LAM	58
5.3.1. Avaliação da atividade da MPO e da NAG	58
5.3.2. Avaliação do recrutamento de macrófagos no PVAT.....	60
5.3.3. Avaliação dos macrófagos produtores de TNF- α no PVAT.....	61
5.3.3. Avaliação do recrutamento de macrófagos no LAM	62
5.3.4. Avaliação dos macrófagos produtores de TNF- α no LAM	63
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÃO.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
9. ANEXO	87
9.1. CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	87

1. Introdução

1.1. Risco cardiovascular associado à obesidade

A obesidade é uma doença complexa e multifatorial que envolve diversos fatores biológicos ¹, psicossociais ², socioeconômicos ³ e ambientais ^{4,5}. Sua patogênese é influenciada por vias e mecanismos heterogêneos, resultando em consequências adversas para a saúde. Embora o Índice de Massa Corporal (IMC) seja amplamente utilizado para avaliar a gordura corporal em populações ⁶⁻⁸, essa escala apresenta limitações na capacidade de prever a adiposidade individual, com variações significativas entre sexos, idades e grupos étnicos ^{9,10}.

Em termos globais, a obesidade tem se tornado uma preocupação crescente, com o número de adultos afetados dobrando em 73 países entre 1980 e 2015 ¹¹, e um contínuo aumento em muitos outros países. Estima-se que entre 39% e 49% da população mundial, o equivalente a 2,8 a 3,5 bilhões de pessoas, apresente sobrepeso ou obesidade ¹². Essa condição tem impacto significativo na saúde pública, sendo a obesidade associada a cerca de 4,0 milhões de mortes em 2015 ¹¹. Dentre essas mortes, mais de dois terços foram atribuídos a doenças cardiovasculares (DCV), mesmo após a consideração de fatores como tabagismo e outras condições de saúde ¹³.

A obesidade é reconhecida como um estado inflamatório caracterizado por aumento do tecido adiposo e redução dos níveis de adiponectina, uma adipocina com características anti-inflamatórias, o que compromete sua capacidade de inibir os processos inflamatórios, resultando na manutenção da inflamação ^{14,15}. Essa disfunção dos adipócitos contribui para o desequilíbrio da homeostase corporal e para a ativação de mecanismos pró e anti-inflamatórios, que desempenham um papel crucial nas complicações metabólicas associadas à obesidade, bem como no comprometimento vascular que leva a alterações cardiometabólicas ¹⁶⁻¹⁹.

Em paralelo ao desenvolvimento da obesidade, ocorre uma infiltração de células inflamatórias, não somente no tecido adiposo, mas também em outros tecidos ²⁰. Nesse sentido, diversos estudos estabeleceram uma clara relação entre biomarcadores inflamatórios e eventos cardiovasculares ^{21,22}.

Adicionalmente, a obesidade está associada à resistência à insulina e à disfunção endotelial, cuja origem pode ser atribuída, em grande parte, à produção de produtos metabólicos derivados de lipídios, hormônios e citocinas pró-inflamatórias^{23,24}. Essa disfunção endotelial é um fator relevante em diversas condições cardiovasculares, incluindo aterosclerose, hipertensão, hiperlipidemia e resistência à insulina, que interferem com a via de sinalização da insulina²⁵⁻²⁷.

Por outro lado, a adiponectina, uma proteína secretada pelo tecido adiposo, exerce uma importante influência na expressão das células endoteliais, afetando mecanismos-chave envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose¹⁹. Entre esses mecanismos, destacam-se a estimulação da produção de óxido nítrico (NO), a regulação de mediadores pró-aterogênicos, a estabilização de placas coronárias e a promoção da vasodilatação arterial²⁸⁻³⁰. Essa ação da adiponectina confere-lhe um papel protetor contra doenças cardiovasculares, além de contribuir para o aumento da sensibilidade à insulina³¹.

1.2. Disfunção do tecido adiposo perivascular

Em relação à vasculatura, a obesidade pode ainda afetar o depósito de gordura no tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* – PVAT) levando à inflamação local, remodelamento vascular e redução do relaxamento vascular³².

O PVAT é uma estrutura de suporte e armazenamento lipídico que possui propriedades secretórias. Esse tecido atua de forma autócrina, parácrina ou endócrina liberando substâncias com propriedades vasoativas que desempenham importante função na regulação do tônus vascular³³. À exceção dos vasos da circulação cerebral, todos os vasos sanguíneos sistêmicos são envolvidos pelo PVAT, que está localizado externamente à camada adventícia. O PVAT é um tecido complexo constituído por diferentes tipos celulares, com predomínio da presença de adipócitos, que podem ser semelhantes aos adipócitos brancos, marrons ou bege.

Os adipócitos brancos são compostos por uma única gotícula lipídica grande, tendo como função o armazenamento de lipídeos, como o colesterol e triglicerídeos. Já os adipócitos marrons possuem atividade mitocondrial, vesículas lipídicas multiloculares e menores e são mais vascularizados³⁴ (Figura 1). Adipócitos bege, por outro lado, apresentam menor atividade mitocondrial e também menos gotículas lipídicas, se

comparados aos adipócitos marrons, sendo formados a partir de adipócitos brancos em um processo denominado *browning* ^{35,36}.

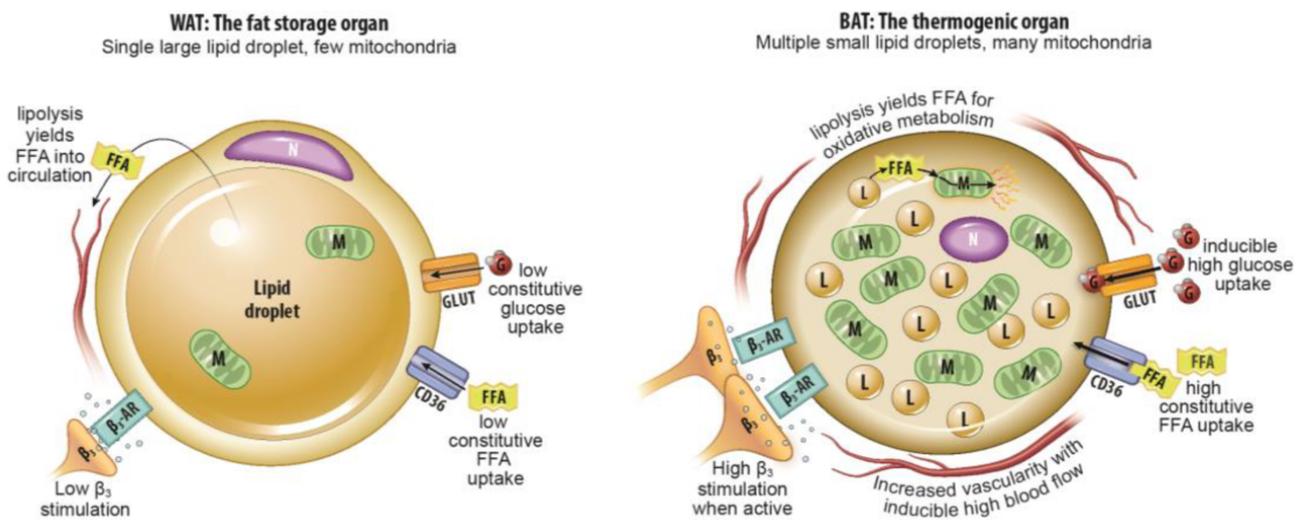


Figura 1. Resumo das principais diferenças fisiológicas entre tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT). Um resumo das principais diferenças fisiológicas relevantes para a geração de imagens entre WAT e BAT. FFA: ácido graxo livre, N: núcleo, M: mitocôndria, β_3 -AR: receptor adrenérgico beta-3, G: glicose, L: gotícula lipídica, CD36: cluster de diferenciação 36/ácido graxo translocase, GLUT: transportador de glicose. Fonte: Frankl et al., 2019.

O tipo de adipócito presente no PVAT varia de acordo com o território vascular ³⁷. Por exemplo, o PVAT torácico, semelhante ao tecido adiposo marrom, é marcado por uma expressão elevada da proteína desacopladora 1 (UCP-1) e do ativador de morte celular CIDE-A ³⁸. Por outro lado, o PVAT abdominal apresenta o fenótipo branco, mas contém uma mistura de adipócitos bege e brancos ³⁹.

De maneira geral, os adipócitos brancos do PVAT têm muitas semelhanças com seus homólogos viscerais, que são classificados morfológicamente pela presença de grandes gotículas lipídicas uniloculares, poucas mitocôndrias e pequenos volumes citoplasmáticos ⁴⁰. Já os adipócitos marrons do PVAT são distintos por suas gotículas lipídicas multiloculares e alta densidade de mitocôndrias ^{39,41}. Em roedores, artérias como as mesentéricas, carótidas e femorais são circundadas por tecido adiposo branco, enquanto a aorta torácica é cercada por tecido adiposo marrom e a aorta abdominal por PVAT bege; uma mistura de adipócitos brancos e marrons (Figura 2) ^{37,42,43}.

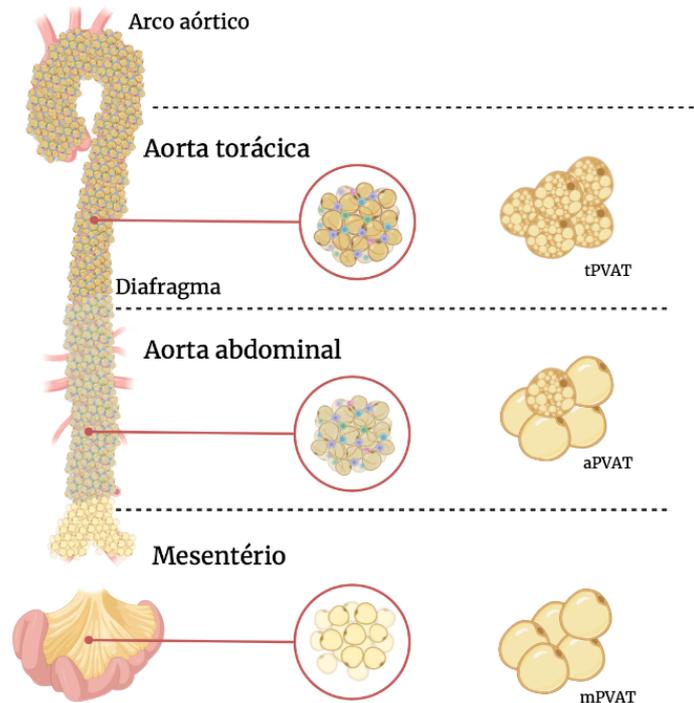


Figura 2. Diferenças anatômicas e morfológicas dos PVATs. As diferenças de cor refletem as diferentes proporções de adipócitos marrons no tecido adiposo. Os tecidos adiposos ao redor da aorta torácica (tPVAT), aorta abdominal (aPVAT) e artéria mesentérica (mPVAT) tem populações distintas de células adiposas derivadas de diferentes progenitores de adipócitos. Adaptado de Li et al., 2021.

O PVAT, fisiologicamente, apresenta efeito de reduzir a resposta contrátil à agentes vasoconstritores. Soltis e Cassis (1991) demonstraram pela primeira vez que o PVAT diminuía a potência da resposta contrátil induzida pela noradrenalina em aortas de ratos ⁴⁴. Dentre os fatores vasorelaxantes produzidos pelo PVAT estão o NO, sulfeto de hidrogênio (H₂S), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), adipocinas (ex.: adiponectina, leptina e resistina), prostaciclina (PGI₂), metil palmitato (PAME) e a angiotensina 1-7. Além disso, o PVAT produz fatores de contração que incluem noradrenalina, espécies reativas de oxigênio (ERO), interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α e quemerina ³⁶. A regulação da produção e eliminação desses fatores contráteis e relaxantes é feita por diversas proteínas presentes no PVAT, como a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e induzida (iNOS), ciclooxigenases (COX1 e COX2) e as isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD) ⁴⁵.

Além do efeito anti-contrátil, o PVAT é capaz de produzir fatores contráteis. Gao e colaboradores demonstraram que ao estimular o nervo perivascular da artéria

mesentérica de ratos foi observada a indução de vasoconstrição, além de apresentada a concepção de que o PVAT expressa subunidades da enzima NADPH oxidase e que o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) produzido foi o responsável pela contração ⁴⁶. O complexo NADPH oxidase tem como função a produção de ERO, sendo considerado o principal responsável pela produção dessas substâncias nas células endoteliais, da musculatura lisa vascular e do PVAT ⁴⁷. A família das NADPH oxidases (Nox) consiste em sete subunidades catalíticas denominadas Nox1-5 e Duox1 e 2 (Dual oxidase) ⁴⁸. São proteínas ligadas à membrana que contêm o sítio de ligação do NADPH e transportadores redox (dois grupos heme e uma flavina) para transferir elétrons através da membrana para o O_2 , gerando $O_2^{\cdot-}$ pela reação ($2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$) e utilizando NADH ou NADPH como espécies doadoras de elétron ⁴⁹, precursor de espécies mais reativas como H_2O_2 , HO^{\cdot} e $HOCl$ ⁵⁰.

Para o controle dessas espécies, o organismo dispõe de mecanismos antioxidantes para que os danos decorrentes da superprodução de ERO sejam minimizados, como a SOD, a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase ⁵¹. Cada enzima atua de uma maneira específica, a família da SOD é composta por três isoformas, SOD1-3, e atua promovendo a dismutação do $O_2^{\cdot-}$, produzindo H_2O_2 e O_2 ($2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) de maneira dependente de Cu^{2+} ou Zn^{2+} como cofatores; já a família da GPx possui 8 isoformas, GPx1-8, que promovem a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via glutathiona reduzida ⁵², ao passo que a catalase converte o H_2O_2 em água e oxigênio molecular ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) ⁵³. Vale ressaltar que os três mecanismos antioxidantes enzimáticos estão expressos no tecido adiposo ^{54,55}.

Por outro lado, em condições não fisiológicas, a produção e secreção de fatores oxidativos e protetores no PVAT de maneira desequilibrada resulta em uma alteração na função anti-contrátil do PVAT, o qual passa a atuar na promoção da disfunção vascular/endotelial em várias doenças, como ocorre na obesidade, por exemplo ^{55,56}.

1.3. Hipertensão arterial secundária à obesidade

Existe uma ligação claramente estabelecida entre obesidade e hipertensão arterial ⁵⁷⁻⁶⁰. O acúmulo de excesso de tecido adiposo inicia uma cascata de eventos que dão origem à pressão arterial elevada (Figura 3), sendo a hipertensão arterial secundária à obesidade uma via comum em crianças e adultos ^{61,62}.

Evidências sugerem que altas cargas calóricas aumentam o turnover de noradrenalina periférica, e dietas ricas em gordura e carboidratos estimulam os receptores periféricos α_1 e β -adrenérgicos, o que eleva a atividade do sistema nervoso simpático (SNS) ^{59,63}. Dentre os mecanismos envolvidos na ativação do SNS durante a obesidade, vale ressaltar: (1) níveis elevados de ácidos graxos livres, típicos do fenótipo obesidade, aumentam a sensibilidade vascular α -adrenérgica e, conseqüentemente, o tônus arterial ⁶⁴; (2) a distribuição de gordura corporal também desempenha um papel na variabilidade do sistema nervoso simpático, sendo que a obesidade central está associada a uma maior ativação do sistema nervoso simpático em comparação com a obesidade subcutânea ⁶⁵; (3) por fim, a sensibilidade do barorreflexo, que normalmente tem um efeito simpato-inibitório em condições de pressão arterial elevada, está diminuída no fenótipo obesidade-hipertensão, contribuindo ainda mais para a atividade aumentada do sistema nervoso simpático ⁶⁶.

Além de mecanismos envolvendo o SNS, a obesidade está associada a maior risco de doença renal crônica ⁶⁷. Durante o início da obesidade, há um aumento na reabsorção tubular renal, resultando em maior retenção de sódio. Em resposta, ocorre vasodilatação renal, que aumenta a filtração glomerular e a quantidade filtrada de água e eletrólitos, na tentativa de compensar o aumento na reabsorção tubular renal. No entanto, essa compensação é incompleta e o volume extracelular é expandido, havendo uma recalibração ascendente da natriurese de pressão. Essa maior avidéz pelo sódio desloca a curva de natriurese de pressão para a direita ⁶⁸, o que requer uma pressão arterial mais alta para excretar o consumo diário de sal e manter o equilíbrio de sódio.

A obesidade também está associada a uma disfunção do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), na qual os níveis plasmáticos de renina, angiotensinogênio, angiotensina II e aldosterona estão todos elevados em indivíduos obesos ⁶⁹. Vários mecanismos tem sido considerados como responsáveis pela ativação do SRAA, incluindo a estimulação do SNS na liberação de renina ⁷⁰, resultando na produção de angiotensina II; a produção de angiotensinogênio no tecido adiposo, especialmente nos adipócitos intra-abdominais ^{70,71}, que leva à geração de angiotensina II e aldosterona; e os efeitos dos ácidos graxos livres, juntamente com outros fatores pouco definidos, na produção e liberação de aldosterona ⁶⁹.

O tecido adiposo em si é também uma fonte de todos os componentes do SRAA^{58,59,72}. O angiotensinogênio produzido pelas células adiposas é liberado no sistema circulatório, aumentando a quantidade disponível para conversão ao longo da cascata que eleva a pressão arterial, e os receptores do SRAA estão bem estabelecidos nos adipócitos⁷². Esse conjunto de eventos resulta em uma atividade aumentada do SRAA.

O excesso de tecido adiposo visceral comprime fisicamente os rins, o que afeta tanto o sistema vascular quanto o tubular, aumentando a ativação do SRAA e a reabsorção de sódio⁶¹. As pressões físicas que a obesidade exerce sobre os rins iniciam uma progressão prejudicial, que vai desde a hiperfiltração, glomerulomegalia (aumento dos glomérulos) até a esclerose da parede dos glomérulos e dos néfrons, resultando, em última instância, na perda de néfrons, o que afeta negativamente a natriurese de pressão⁶². Essas mudanças estruturais nos rins resultam em maior retenção de sódio e aumento da pressão arterial.

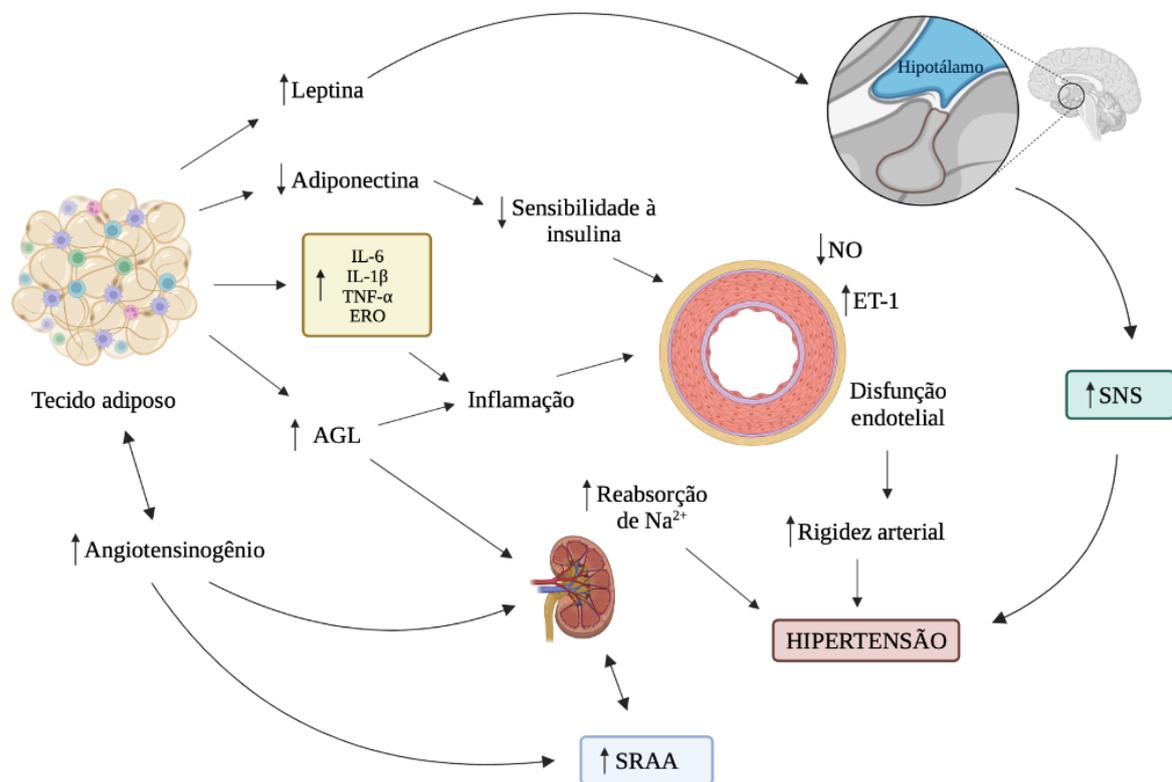


Figura 3. Mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial induzida pela obesidade. AGL: ácido graxo livre, ERO: espécies reativas de oxigênio, ET-1: endotelina 1, IL-6: interleucina-6, IL-1B: interleucina-1b, NO: óxido nítrico, SNS: sistema nervoso simpático, SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa Adaptado de Kotsis et al., 2010.

1.4. Tratamento farmacológico do paciente obeso e hipertenso

As Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial de 2020 apontam a obesidade como uma das principais causas da hipertensão arterial secundária ⁷³, colocando os indivíduos diagnosticados nessa condição em maior risco cardiovascular e com maior impacto nos órgãos-alvo ⁷⁴. Nesse contexto, é recomendado iniciar o tratamento anti-hipertensivo sempre que a pressão arterial atingir ou ultrapassar 140/90 mmHg ⁷⁵. Considerando as diversas alterações metabólicas induzidas pela obesidade, a escolha da terapia medicamentosa deve ser pensada de forma a melhorar, ou ao menos não piorar, a condição clínica do paciente. Nesse sentido, os β -bloqueadores são apontados como uma opção terapêutica nesse cenário ⁷³.

Os β -bloqueadores são classificados em três gerações distintas, cada uma com mecanismos de ação diferentes. Os de primeira geração atuam como antagonistas dos receptores β_1 e β_2 , enquanto os de segunda geração são seletivos para os receptores β_1 . Já os de terceira geração são seletivos para os receptores β_1 e possuem efeitos adicionais, incluindo o bloqueio α_1 -adrenérgico, a ativação dos receptores β_3 -adrenérgicos e ação antioxidante e vasodilatadora (Figura 4) ⁷⁶.

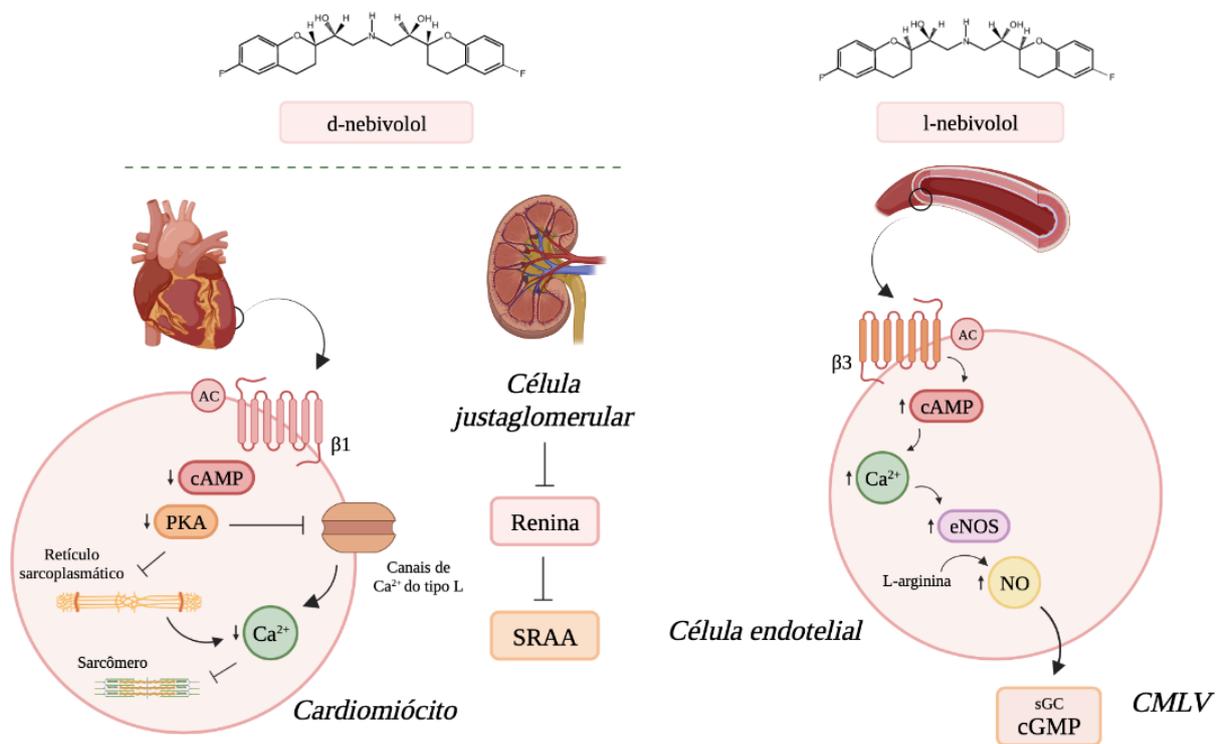


Figura 4. Mecanismos distintos de cada isômero do nebivolol. Visão geral dos efeitos do nebivolol no coração, rins e sistema vascular: O D-nebivolol antagoniza os β_1 -adrenoreceptores em cardiomiócitos e

em células justaglomerulares. O L-nebivolol induz a liberação de NO via β_3 -agonismo, estimulando o relaxamento vascular. AC: adenilil ciclase, Ca^{2+} : cálcio, cAMP: monofosfato cíclico de adenosina 3',5', cGMP: monofosfato cíclico de guanosina 3',5', eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, NO, óxido nítrico, PKA: proteína quinase A, SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona, sGC: guanilil ciclase solúvel, CMLV, célula muscular lisa vascular.

Os β -bloqueadores de primeira geração podem piorar a homeostase da glicose, agravar a resistência à insulina e reduzir os níveis de HDL ^{77,78}. No entanto, os β -bloqueadores de terceira geração, como o nebivolol, são indicados para uso em pacientes hipertensos com comorbidades, como a obesidade ⁷⁹. O nebivolol pertence a essa classe de fármacos e possui ações metabólicas e endócrinas benéficas que favorecem seu uso em indivíduos obesos. Esse medicamento tem ação positiva na homeostase da glicose, reduz a resistência à insulina, diminui os níveis de colesterol total, LDL e triglicédeos, além de aumentar o HDL ^{79,80}.

O nebivolol também promove ação vasodilatadora mediada pela ativação dos receptores β_3 endoteliais, aumentando a produção de NO e revertendo a hipercontratibilidade vascular associada à hipertensão arterial ⁸¹. Para isso, o nebivolol aumenta a fosforilação do resíduo de ativação Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, aumentando a biodisponibilidade de NO ^{82,83}.

O efeito antioxidante do nebivolol é de extrema importância para sua ação protetora nos vasos sanguíneos. Esse medicamento exerce essa ação ao reduzir a expressão das subunidades catalíticas da enzima NADPH oxidase, como Nox1, Nox2 e Nox4 ⁸³⁻⁸⁵. Estudo comparativo entre o nebivolol e metoprolol, antagonistas dos receptores β_1 -adrenérgicos de terceira e segunda geração, respectivamente, demonstrou que o nebivolol atenuou significativamente a remodelação vascular e a deposição de colágeno associada à hipertensão, além de também conter os aumentos na atividade da NADPH oxidase aórtica, níveis de $O_2^{\cdot-}$ e de nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica, respostas essas não observadas com o tratamento com o metoprolol ⁸⁶.

Além disso, estudos em animais obesos demonstraram que o nebivolol reduz a ativação do inflamassoma NLRP3 e aumenta a expressão de enzimas antioxidantes, como a SOD e catalase, bem como dos receptores β_3 na vasculatura ⁸². Vale ressaltar que o receptor β_3 também é expresso no PVAT, e o aumento de sua expressão foi associado à recuperação da função anti-contrátil do PVAT em modelos de obesidade ⁸⁷. De fato, a

ativação desses receptores no PVAT desencadeia um importante mecanismo de relaxamento vascular, resultando na produção de adiponectina, um hormônio com propriedades vasculoprotetores ⁸⁸. Embora já se tenha relatos sobre o papel anti-inflamatório do nebivolol em reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , e do fator de transcrição NF κ B ^{89,90}, não há dados que demonstrem a ação anti-inflamatória do fármaco no PVAT.

Essas ações combinadas do nebivolol, incluindo seu efeito antioxidante e sua influência na regulação de receptores β_3 no PVAT, contribuem para sua eficácia no tratamento de pacientes com obesidade e hipertensão arterial, proporcionando benefícios vasculares e cardiometabólicos significativos. No entanto, não há dados que evidenciem os efeitos do nebivolol sobre a alteração do fenótipo anti-contrátil do PVAT durante quadro hipertensivo induzido pela obesidade.

2. Justificativa

A obesidade é uma condição complexa associada ao aumento do risco cardiovascular. Sua patogênese envolve diversos fatores, resultando em alterações metabólicas e inflamatórias. Além do mais, a relação entre obesidade e hipertensão arterial é de grande relevância para a saúde do indivíduo. Nesse contexto, o PVAT emerge como uma estrutura de interesse na regulação do tônus vascular e no desenvolvimento de alterações cardiometabólicas associadas à obesidade, uma vez que este pode contribuir para a disfunção vascular e hipertensão arterial em situações fisiopatológicas. No entanto, a literatura ainda é escassa acerca dos efeitos do nebivolol, um β -bloqueador de terceira geração, sobre o PVAT durante a hipertensão arterial secundária à obesidade. Nesse sentido, o estudo buscou entender o papel do PVAT na hipertensão arterial relacionada à obesidade e o potencial terapêutico do nebivolol para preservar a função vascular. A hipótese deste trabalho foi de que a obesidade promoveria aumento da pressão arterial e alteração do fenótipo anti-contrátil do PVAT. O tratamento com nebivolol reduziria a pressão arterial e restauraria a ação anti-contrátil do PVAT por mecanismos que envolveriam redução do *burst* oxidativo.

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

Investigar os mecanismos moleculares e celulares pelos quais o nebivolol pode atuar sobre a disfunção do PVAT e como isso afeta a função vascular durante a obesidade.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a associação entre a obesidade e o desenvolvimento da hipertensão arterial.
- Avaliar o efeito do tratamento com nebivolol sobre a disfunção vascular em artérias desnudadas do PVAT ou com o PVAT intacto durante a obesidade.
- Investigar a participação do *burst* oxidativo na disfunção vascular associada à obesidade e o papel do nebivolol nessa resposta.
- Avaliar a influência do nebivolol sobre a inflamação crônica e de baixa intensidade induzida pela obesidade.

4. Métodos

4.1. Animais:

Foram utilizados ratos *Wistar Hannover* com idades médias entre 50 e 70 dias (260-280 g) provenientes do Biotério Central do *Campus* da USP de Ribeirão Preto. Os ratos foram mantidos no Biotério de Manutenção da EERP/USP com temperatura controlada por ar condicionado tipo split (22-24 °C), ciclo automático de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas entre 06:00 e 18:00 horas) e livre acesso à água (ou solução de sacarose) e ração. Os ratos permaneceram em rack ventilada (modelo AL21, ALESCO, Brasil) agrupados em 2 em mini-isoladores de polissulfona (modelo Ventlife, ALESCO, Brasil) com área de 1.632 cm² (48 cm x 34 cm x 21 cm). A cama de maravalha foi trocada 3 vezes/semana. A desinfecção dos mini-isoladores foi feita com amônia quaternária e hipoclorito de sódio. Os protocolos desse estudo estão de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EERP/USP (protocolo nº 21.1.304.22.3).

4.2. Grupos experimentais:

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) Controle: os animais foram alimentados por 14 semanas com dieta padrão Nuvilab® (Nuvital, Colombo, Paraná, Brasil) que possui densidade energética de 12,26 kJ/g; 2) Obeso: os animais foram alimentados por 14 semanas com dieta altamente palatável e com alto teor de açúcar que consiste (em peso): 33% de dieta padrão moída, 33% de leite condensado Nestlé, 7% de sacarose e 27% de água com densidade energética de 13,35 kJ/g⁹¹ e, além disso, foi adicionado sacarose 100 mg/mL na água do bebedouro; 3) Nebivolol: os animais foram alimentados com dieta padrão Nuvilab® por 14 semanas, sendo que nas últimas 4 semanas (semanas 10 a 14) receberam neбиволol (10 mg/kg/dia, gavagem). O neбиволol foi solubilizado em solução de carboximetilcelulose 0,25%⁹²; 4) Obeso+neбиволol: os animais foram alimentados com dieta altamente palatável por 14 semanas, sendo que nas últimas 4 semanas (semanas 10 a 14) receberam neбиволol (10 mg/kg/dia, gavagem) e, além disso, foi adicionado sacarose 100 mg/mL na água do bebedouro (Figura 2). Os animais dos grupos Controle e Obeso receberam o veículo do neбиволol (10 mL/kg) por gavagem para simular administração do fármaco.

A escolha do modelo de obesidade utilizando dieta hipercalórica altamente palatável foi baseada em estudo no qual foi descrito que o modelo é o que mais se assemelha à dieta ocidental em humanos ⁹¹. O período de tratamento com a dieta (10 semanas) foi determinado com base em estudo prévio em ratos *Wistar Hannover* ⁹³, no qual foi demonstrado que após 10 semanas de tratamento os animais desenvolveram perda no efeito anti-contrátil do PVAT periaórtico. Nesse sentido, o tratamento farmacológico com o nebivolol foi iniciado após 10 semanas de tratamento com a dieta hipercalórica, sendo o período de tratamento, bem como a dose e a via de administração baseados em estudo anterior ⁹⁴, no qual foi demonstrado que o nebivolol teve ação benéfica em parâmetros oxidativos, inflamatórios além de cardioproteção e vasodilatação em animais obesos que receberam dieta hiperlipídica.

Ao término do período experimental (14ª semana), os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uretana 1,25g/kg em solução de 25% (5 mL/kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mortos por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. Para realização dos experimentos funcionais foi coletado o 3º ramo de artérias mesentéricas com ou sem PVAT. Para os experimentos bioquímicos foram utilizados o leito arterial mesentérico (LAM) e o PVAT, que foram aliquoteados e congelados a -80 °C até a realização de cada ensaio. A escolha da região estudada se sustenta em achados da literatura, que relataram o envolvimento de artérias de resistência no controle da pressão arterial ⁹⁵.

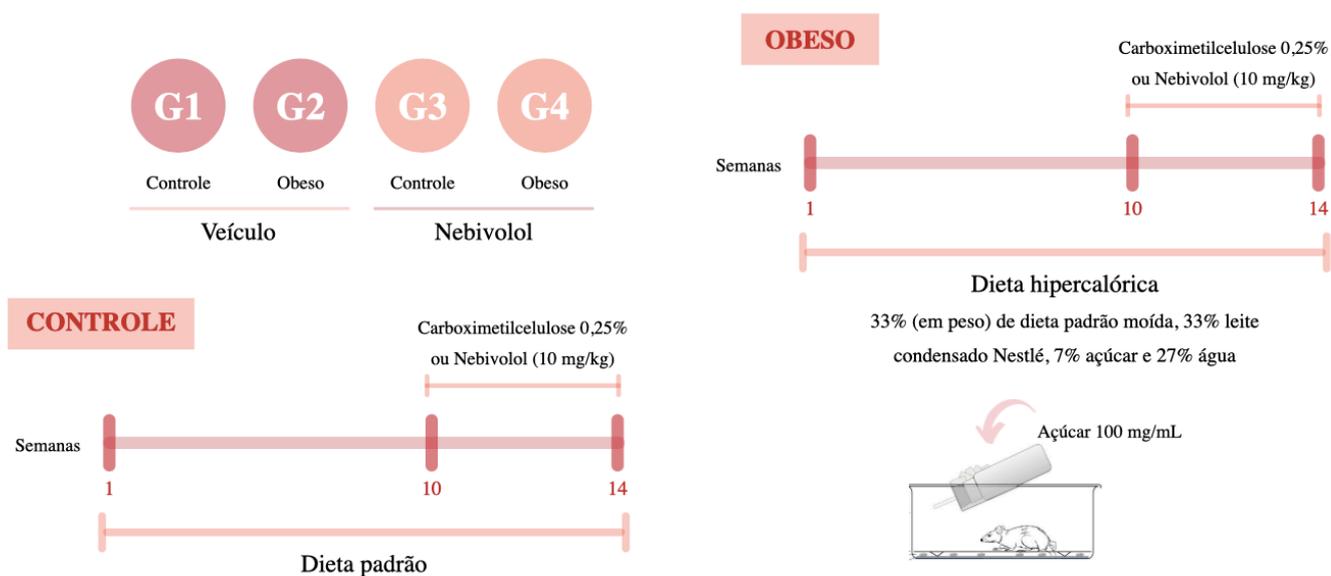


Figura 5. Modelo experimental. Os animais receberam por período de 10 semanas dieta padrão (grupo Controle) ou dieta hipercalórica (grupo Obeso) que consiste (em peso): 33% de dieta padrão moída, 33% de leite condensado Nestlé, 7% de sacarose e 27% de água (densidade energética de 13,35 kJ/g). Ao término das 10 semanas, parte dos animais de ambos os grupos foi tratada com neбиволol (10 mg/kg/dia, gavagem) por 4 semanas. Os experimentos funcionais foram realizados em artérias mesentéricas com e sem PVAT ao término do período experimental (14ª semana). Sangue, artéria mesentérica e PVAT do leito arterial mesentérico foram coletados para realização de avaliações bioquímicas.

4.3. Perfil nutricional, metabólico e endócrino:

O peso dos animais e consumo de ração (gramas) e líquido (mL) foram avaliados semanalmente. Para isso, foi feita uma estimativa calculada por média, considerando que os animais estavam agrupados em pares por caixa. Como a obesidade é definida como uma quantidade excessiva de gordura corporal em relação à massa magra, um índice de adiposidade foi considerado a partir da soma de diversas camadas adiposas. A gordura corporal total (GCT) foi medida pela soma dos pesos individuais das camadas adiposas: epididimal, retroperitoneal e mesentérica. O índice de adiposidade foi calculado pela razão: [(gordura corporal total/peso corporal final) x 100]. Foram avaliadas as concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, creatinina, Na⁺ e K⁺ (Labtest Diagnóstica SA, Brasil, cód. 133, 87, 76, 13, 35, 124, 125, respectivamente). Foi feito o jejum de 12 horas para a coleta do sangue dos animais com base em estudo prévio ⁹³.

4.4. Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca:

A pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca foram avaliadas semanalmente em ratos acordados, pela técnica não invasiva de pletismografia de cauda (Plestismógrafo - EFF 306 - Insight, Brasil). Antes das medidas, os animais foram submetidos a adaptação no equipamento, onde foram realizadas aferições da pressão arterial nos 3 dias que antecediam o início da coleta até se obter 3 aferições em que os animais estivessem estáveis durante todo o processo. Após a adaptação, as medidas foram registradas com base na média de 3 aferições estáveis de PAS e frequência cardíaca. O procedimento consistiu em um aquecimento prévio dos animais em uma caixa com temperatura média de 37 °C por 15 minutos. Após o aquecimento, os níveis pressóricos dos ratos foram determinados por meio de oclusor, o qual foi ajustado à porção proximal da cauda e acoplado a um transdutor pneumático caudal elétrico conectado a um sistema de transdução. Os resultados da PAS estão expressos em mmHg e da frequência cardíaca em bpm.

4.5. Estudo funcional da reatividade vascular em artéria mesentérica:

Experimentos funcionais foram conduzidos no 3º ramo de artérias mesentéricas com endotélio intacto na presença ou ausência de PVAT [PVAT(+) e PVAT(-), respectivamente]. Os anéis foram transferidos para um miógrafo (Mulvany–Halpern modelo 610M; DanishMyo Technology, Copenhagen, Dinamarca) e os dados foram obtidos utilizando um PowerLab 8/SP (ADInstruments, Castle Hill, Austrália). Os anéis foram mantidos em temperatura constante de 37 °C e gaseificados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) em solução de Krebs modificado cuja composição é (em mmol/L): 130 NaCl, 4,7 KCl, 14,9 NaHCO₃, 1,18 KH₂PO₄, 1,17 MgSO₄.7H₂O, 5,5 glucose, 1,56 CaCl₂.2H₂O e 0,026 EDTA.

4.5.1. Normalização

O objetivo do procedimento de normalização é definir a circunferência interna de um segmento vascular na qual o desenvolvimento máximo de força ocorre (IC 1). Para alcançar esse objetivo, é determinada a circunferência interna (IC 100) que o segmento vascular teria quando completamente relaxado a uma pressão transmural específica. No caso das artérias mesentéricas de resistência, a pressão transmural alvo é de 100 mmHg, o que corresponde a 13,3 kPa (Mulvany e Halpern, 1977).

Após um período de aquecimento dos segmentos vasculares por 15 minutos em uma solução de Krebs modificado, gaseificada com 95% O₂ e 5% CO₂, os anéis vasculares foram distendidos gradualmente, e as medidas da distância entre os dois fios (em µm) e da força aplicada foram registradas em intervalos regulares. Utilizando um programa de normalização (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália), a circunferência interna foi calculada com base na distância entre os dois fios e no diâmetro desses fios, enquanto a tensão na parede (em mN/mm) foi obtida dividindo-se a força pelo comprimento da parede (duas vezes o comprimento do segmento vascular). A partir da equação de Laplace [$P = \text{tensão na parede} / (\text{circunferência interna} / (2\pi))$], foi possível estimar a pressão necessária para distender o segmento vascular em cada circunferência interna calculada.

A IC100 foi determinada ajustando a equação de Laplace à curva gerada pela tensão na parede do vaso em função da circunferência interna. A IC1 foi então calculada a partir da IC100 utilizando a fórmula $IC1 = 0,90 \times IC100$, resultando em uma

circunferência interna na qual a produção de força ativa e a sensibilidade do segmento a agonistas atingem seu máximo. O diâmetro interno normalizado foi obtido dividindo-se a IC1 por π .

4.5.2. Protocolo experimental

A contração induzida por KCl (60, 90 e 120 mmol/L) foi determinada em preparações com ou sem PVAT com a finalidade de avaliar a integridade do músculo liso. A integridade do endotélio foi testada pelo relaxamento induzido pela acetilcolina (10 $\mu\text{mol/L}$) sobre contração mantida com fenilefrina (3 $\mu\text{mol/L}$).

Curvas de concentração-resposta para fenilefrina (10 nmol/L - 10 $\mu\text{mol/L}$) foram determinadas nas artérias PVAT(+) e PVAT(-). Para avaliação do envolvimento do aumento do estresse oxidativo sobre a função vascular, foram feitas curvas de resposta à concentração para fenilefrina em artérias pré-incubadas por 30 min com tiron (1 mmol/L, sequestrador de $\text{O}_2^{\cdot-}$) e com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$, inibidor não seletivo da NOS). A concentração do inibidor foi escolhida com base em trabalhos anteriores^{96,97}.

A partir das curvas concentração-resposta, foram determinados por regressão não linear o valor de pD_2 que consiste no logaritmo negativo da concentração molar do agente vasoativo que promove 50% do efeito máximo (EC_{50}), bem como os respectivos efeitos máximos (E_{max}), que foram expressos em mN/mm.

4.6. Determinação do balanço redox no PVAT e LAM:

4.6.1. Determinação da geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/L de KH_2PO_4 , 1 mmol/L de EGTA e 150 mmol/L de sacarose). A reação foi iniciada pela adição do substrato NADPH (0,1 mmol/L) a uma suspensão (com volume final de 250 μL) contendo amostra (50 μL), lucigenina (5 $\mu\text{mol/L}$) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores de luminescência foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura em um luminômetro Orion II (*Berthold detection systems*, Pforzheim, Alemanha). Em todos os protocolos experimentais, o conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativas de luz)/mg de proteína.

4.6.2. Determinação da atividade da SOD:

Os tecidos foram homogeneizados em PBS pH 7,4, sendo o homogenato centrifugado a 4.000 rpm, 4 °C por 12 min. Em seguida, 20 µL de sobrenadante foram adicionados à placa para iniciar a reação com o tetrazólio (solução de trabalho) (#19160, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Quanto menor a atividade da SOD, maior a concentração de O₂^{•-} na amostra, que por sua vez reagiu com o tetrazólio levando a formação do formazam, que possui coloração amarela. Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e estão expressos em % de inibição, ou seja, a capacidade da SOD em inibir a reação do O₂^{•-} com o tetrazólio.

4.6.3. Avaliação da concentração de H₂O₂:

A concentração extracelular de H₂O₂ foi avaliada por fluorimetria ($\lambda_{\text{excitação}}$ 571, $\lambda_{\text{emissão}}$ 585 nm) em homogenatos seguindo as especificações do fabricante do kit Amplex®Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (#A22188, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os tecidos foram homogeneizados em solução de Krebs (mmol/L): NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; CaCl₂ 1,6; pH 7,4). O homogenato obtido foi centrifugado (10.000 × g, 4 °C, 5 min). Para a montagem da placa, a cada 50 µL do sobrenadante obtido foi adicionado 50 µL de solução composta pelo reagente Amplex®Red (10-acetil-3,7-diidroxifenoxazine). Uma curva padrão de H₂O₂ foi construída e os valores de concentração obtidos nas amostras estão expressos em nmol/L/mg proteína.

4.6.4. Determinação da atividade da catalase:

Os tecidos foram homogeneizados com tampão fosfato pH 7,2 e centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, 50 µL das amostras foram adicionadas em microtubos contendo 20 µL de H₂O₂ em cada tubo. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, transferimos 50 µL das misturas de amostras, branco ou padrões de H₂O₂ para eppendorfs contendo 950 µL de reagente FOX 1, preparado com 1 mL da solução 1 (91,2 mg de laranja de xilenol e 117,6 mg de sulfato ferroso de amônio em 120 mL de H₂SO₄ 250 mM) em 9 mL da solução 2 (29,1 mg de BHT em 30 mL de metanol). A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e, então, lida em espectrômetro a 560 nm. Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e comparados com uma curva padrão de H₂O₂.

4.6.5. Determinação da concentração de malonaldeído (MDA):

Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,4 e amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas ($1.600 \times g$, 10 min, 4 °C). Em seguida, 100 µL de amostra foi transferido para microtubos de 1,5 mL aos quais foram posteriormente adicionados 100 µL de água Milli-Q®, 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS 8,1%), 350 µL de tampão ácido acético pH 3,5 e 350 µL de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Uma curva padrão de malondialdeído (MDA) foi preparada a partir de volumes crescentes de MDA (0,03 mM) sendo as concentrações finais de 22,5, 15, 7,5, 3,75 e 0 mol/L. Em seguida as amostras foram deixadas em banho de aquecimento (95 °C, 1 h) e em seguida centrifugadas ($1.600 \times g$, 10 min, 4 °C). 150 µL do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços e a concentração de MDA foi determinada colorimetricamente em comprimento de onda de 532 nm utilizando a curva para MDA como referência. Os resultados dos tecidos e do plasma foram expressos em nmol/mg de proteína e nmol/mL, respectivamente.

4.7. Avaliação da via nitrérgica no PVAT e LAM:

4.7.1 Determinação da concentração de nitrito (NO_2^-):

Os tecidos foram homogeneizados em PBS e centrifugados ($10.000 \times g$, 10 min, 4 °C) e amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas ($16000 \times g$, 10 min, 4 °C). Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços onde posteriormente foi adicionado 50 µL do reagente de griess (5% de H_3PO_4 ; 0,2% de N-(1-Naphthyl)Ethyl-Enediamine e 2% de sulfanilamida) e após 10 min a placa foi lida no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão com concentrações finais de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 0 µmol/L. Os resultados dos tecidos e do plasma foram expressos em µmol/mg de proteína e µmol/mL, respectivamente.

4.8. Avaliação inflamação no PVAT e LAM:

4.8.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO):

A quantificação do acúmulo de neutrófilos foi avaliada pela determinação da atividade da enzima MPO. As amostras foram homogeneizadas em tampão EDTA-fosfato de sódio (NaCl 0,1 mol/L; $NaPO_4$ 0,02 mol/L; Na_2EDTA 0,015 mol/L, pH 4,7),

agitadas vigorosamente, e centrifugadas a 9.600 x g por 10 min e 4 °C. O sedimento foi ressuspenso em solução de lise hipotônica (NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L (pH 5,4), contendo 0,5% brometo de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio (HTAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), detergente iônico importante para a solubilização da MPO, facilitando sua extração. As amostras passaram por três ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas (9.600 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante utilizado para a medida da atividade da MPO. O ensaio foi realizado pela adição de 25 µL das amostras a 25 µL de substrato 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB 1,6 mmol/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU A), que foram incubados a 37 °C por 5 min. Em seguida, 25 µL de H₂O₂ 0,002% foram adicionados à placa, e novamente incubada a 37 °C por 5 min. A reação foi paralisada pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 4 mol/L. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro. A atividade da MPO foi expressa como unidades relativas D.O./mg de proteína.

4.8.2. Determinação da atividade da N-acetilglucosaminidase (NAG):

A quantificação do acúmulo/ativação de macrófagos teciduais foi avaliada pela determinação da atividade da enzima NAG (unidades relativas D.O./mg de proteína) no PVAT e LAM. As amostras foram homogeneizadas em tampão EDTA-fosfato de sódio (NaCl 0,1 mol/L; NaPO₄ 0,02 mol/L; Na₂EDTA 0,015 mol/L, pH 4,7), agitadas vigorosamente e centrifugadas (9.600 x g, 10 min, 4 °C). O sedimento foi ressuspenso em solução de lise hipotônica (NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%) e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em salina triton 0,1%. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas (9.600 x g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade da NAG. O ensaio foi realizado pela adição de 100 µL das amostras a 100 µL de substrato 4-nitrofenil N-acetil-β-D-glicosaminida (#N9376, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foram incubados a 37 °C por 10 min. Em seguida, 100 µL de tampão glicina 0,2 mol/L foram adicionados à placa. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (405nm).

4.8.3. Citometria de fluxo

O PVAT e LAM foram coletados em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) e posteriormente a digestão foi feita usando colagenase tipo II (1,0 mg/mL) e DNase (0,25 U/mL) à 37 °C, sob rotação de 200 rpm por 45 min. Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro de 40 µm (#22-363-547, Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e lavadas 3 vezes com meio RPMI-1640. As amostras foram novamente centrifugadas a 8.000 rpm por 2 min e ressuspensas em 1 mL de RPMI-1640. A quantidade de células totais foi contada em câmara de Neubauer. Posteriormente foi adicionado o BD FcBlock™ (#564220, BD Biosciences) por 15 min a temperatura ambiente para evitar ligações não específicas dos anticorpos. Por fim, um total de 1×10^6 células foi marcado com um mix de anticorpos específicos para detecção de macrófagos: Pacific Blue™ anti-rat CD45 (#202225, Biolegend), rat anti-rt1B percep MAB (#557016, BD Bioscience), rat anti-CD3 FITC MAB (#557354, BD Bioscience), cam/rat anti-TNF PE MAB (#559503, BD Bioscience), APC Mouse Anti-Rat CD11b (#562102, BD Bioscience). A aquisição do sinal das células marcadas e ativadas por fluorescência foi obtida em citômetro de fluxo e os dados foram analisados pelo software FlowJo (FlowJo LLC, Oregon, EUA).

4.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Análise da PAS e frequência cardíaca foi realizada a partir de medidas repetidas. Análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni foi realizada para detectar as diferenças entre os valores em estudo. $P < 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5. Resultados

5.1. Perfil nutricional e caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica

5.1.1. Avaliação do consumo de ração e líquido

Inicialmente, avaliamos o padrão de consumo de ração e líquido ao longo do tratamento para o acompanhamento da evolução do peso dos animais. Nesse sentido, foi feita a avaliação do consumo médio de ração e água semanalmente durante as 14 semanas de tratamento. Conforme observamos na Figura 6A, os animais que receberam a dieta hipercalórica apresentaram maior consumo médio de ração nas três primeiras semanas de tratamento, no entanto, ao decorrer do tratamento o consumo médio de ração foi equiparável ao de animais mantidos com dieta padrão. Em contrapartida, vemos na Figura 6B que o consumo médio de líquido foi maior em animais tratados com dieta hipercalórica se comparado a animais tratados com dieta padrão. Em ambos os casos, o tratamento com neбиволol não exerceu influência sobre os parâmetros analisados.

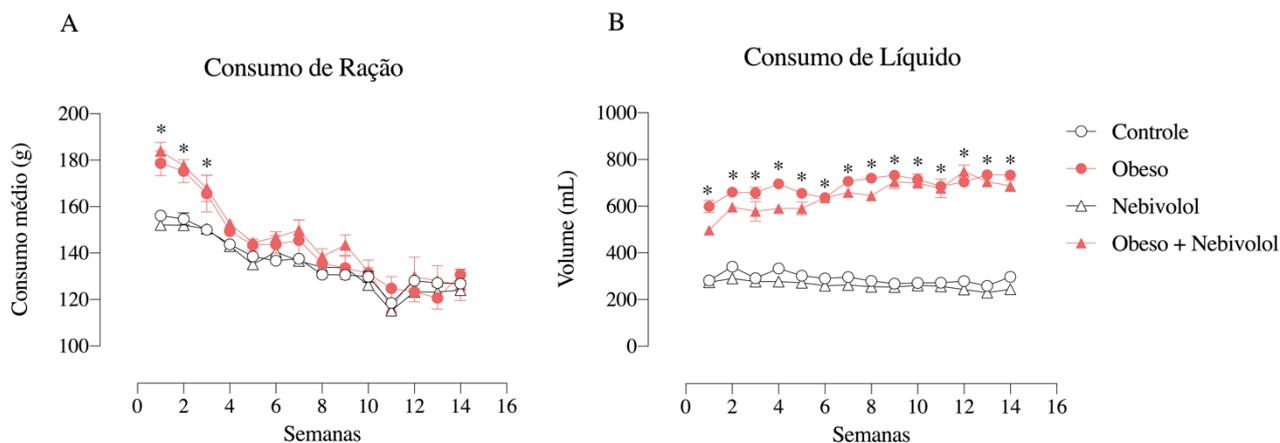


Figura 6. Avaliação do consumo de ração (A) e líquido (B). Cada ponto representa a média semanal \pm E.P.M de $n=8-16$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle e neбиволol ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.1.2. Evolução da massa e ganho de massa total

O excesso de peso, muitas vezes em decorrência do balanço energético positivo, é o primeiro marcador para o diagnóstico da obesidade. Nesse sentido, avaliamos semanalmente a massa dos animais durante as 14 semanas de tratamento. Conforme observamos na Figura 7A, os animais que receberam a dieta hipercalórica apresentaram maior ganho de massa desde a terceira semana de tratamento, tendência essa que se manteve até o final da 14ª semana. A partir desses dados, observamos que animais dos grupos obeso e obeso + nebivolol apresentaram ganho de massa cerca de 30% maior em comparação a animais do grupo controle (Figura 7B). Além disso, a capacidade de conversão das calorias da dieta em massa, a chamada eficiência alimentar, foi maior em animais submetidos à dieta hipercalórica se comparada a animais submetidos à dieta padrão (Figura 7C). Em todos os casos, o tratamento com nebivolol não exerceu influência sobre os parâmetros analisados.

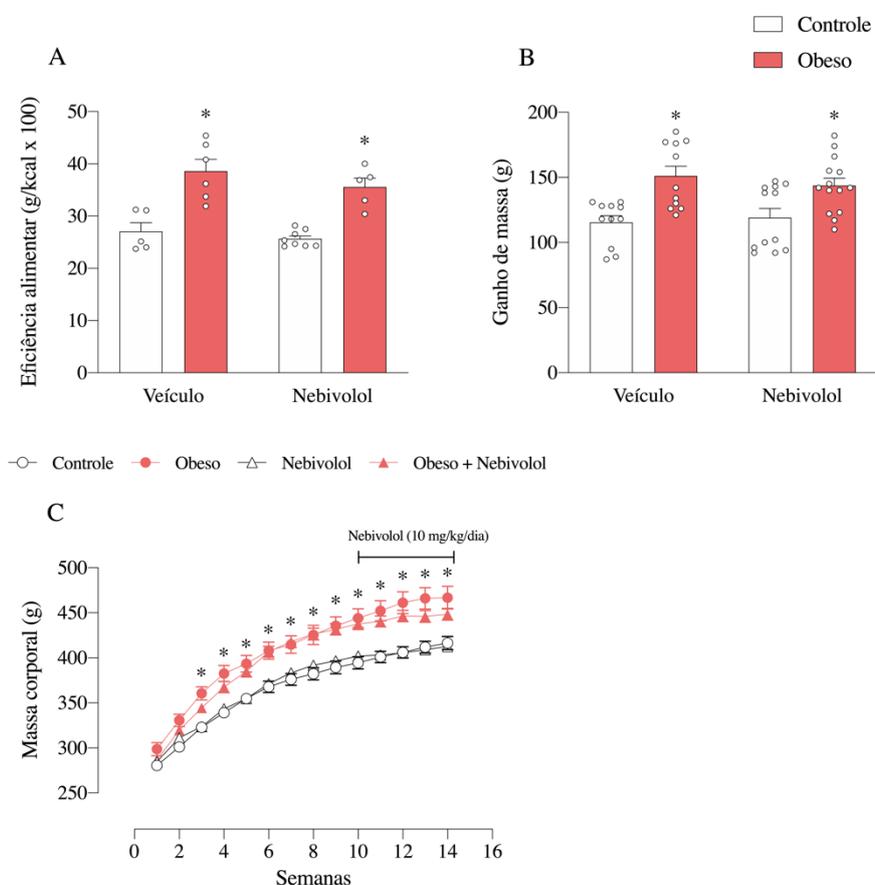


Figura 7. Evolução da massa corporal (A), ganho de massa total (B) e eficiência alimentar (C) dos animais mantidos sob dieta padrão e hipercalórica. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=11-16$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle e nebivolol ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.1.3. Avaliação da hipertrofia de tecidos adiposos e índice de adiposidade

O principal sinal da obesidade é o excesso de gordura corporal, o que aumenta o risco a problemas graves de saúde. Nesse sentido, ao final da 14ª semana de tratamento foram coletados os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e mesentérica para a avaliação da hipertrofia desses tecidos adiposos. Observamos que o consumo da dieta hipercalórica promoveu maior hipertrofia dos tecidos adiposos epididimal (Figura 8A), retroperitoneal (Figura 8B) e mesentérico (Figura 8C). Em consequência, animais tratados com a dieta hipercalórica apresentaram maior índice de adiposidade em comparação a animais tratados com dieta padrão (Figura 8D). No entanto, o tratamento farmacológico com o nebivolol não reverteu nenhum desses parâmetros, evidenciando que o fármaco estudado não exerce função sobre o peso e excesso de gordura dos animais.

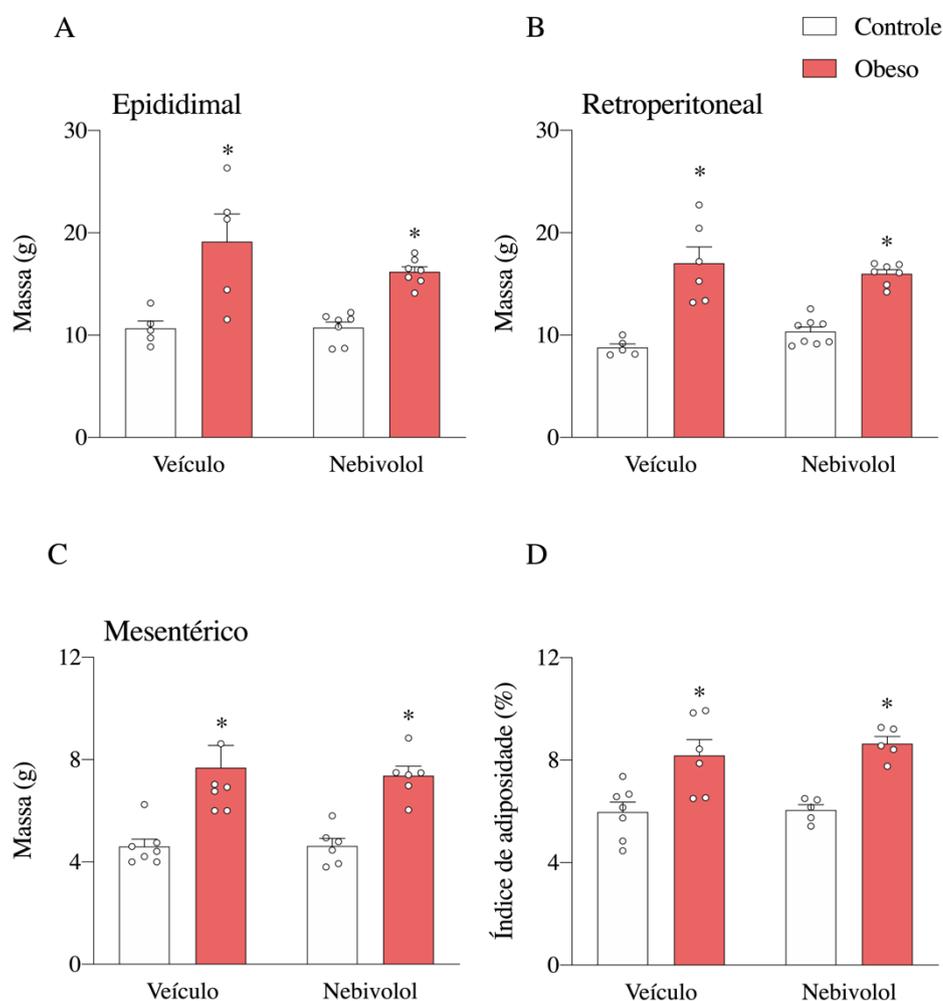


Figura 8. Efeito da dieta hipercalórica sobre os tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B), mesentérico (C) e o índice de adiposidade (D). Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-8$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle e nebivolol ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.1.4. Evolução da PAS e frequência cardíaca

Conforme mencionado anteriormente, a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial, por exemplo. Nesse sentido, o acompanhamento da PAS dos animais foi feito semanalmente durante as 14 semanas de tratamento. Conforme observamos na Figura 9A, os animais que receberam a dieta hipercalórica apresentaram elevação na PAS a partir da 10ª semana de tratamento, resultado esse que se manteve até o final da 14ª semana. Além disso, observamos também que os animais tratados com dieta hipercalórica apresentaram aumento na frequência cardíaca a partir da 10ª semana, sendo essa elevação persistente até o final do tratamento (Figura 9B). Como esperado, o tratamento com nebivolol foi capaz de reverter o aumento da PAS e frequência cardíaca induzidos pelo modelo experimental de obesidade.

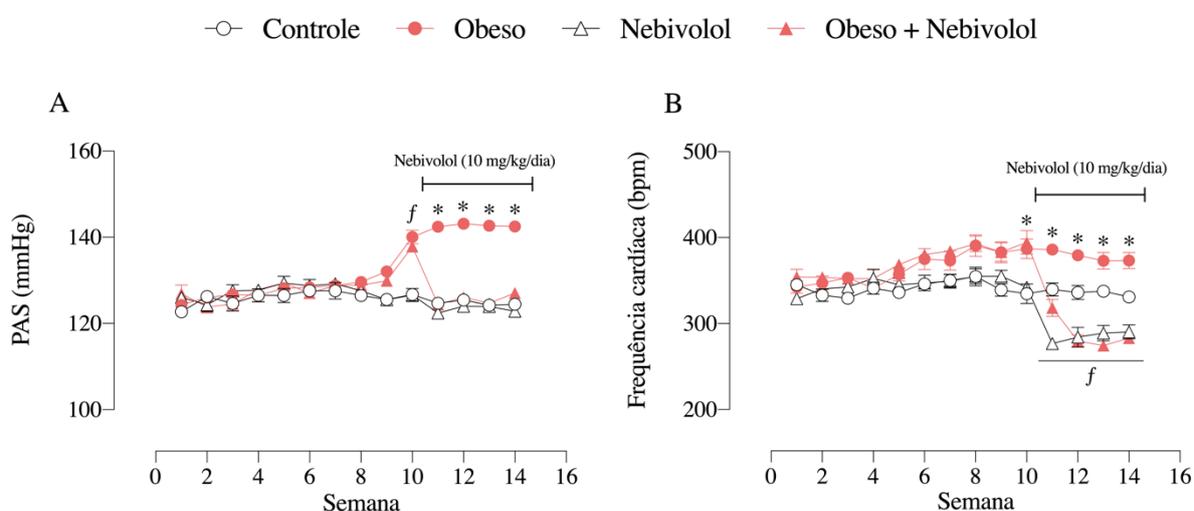


Figura 9. Efeito da obesidade sobre a PAS, frequência cardíaca e correlação entre massa corpórea e pressão arterial sistólica. Foi utilizada pletismografia caudal para avaliação da PAS (A) e frequência cardíaca (B) e posterior correlação da massa-PAS (C). Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=12-16$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle e nebivolol ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.1.5. Avaliação do perfil lipídico

Além do excesso de peso e hipertensão arterial, a dislipidemia compõe a lista de fatores associados ao desenvolvimento da síndrome metabólica. Nesse sentido, para avaliar se o modelo experimental de obesidade induz o quadro de dislipidemia, ao final da 14ª semana de tratamento o plasma foi coletado para avaliação do perfil lipídico.

Na Figura 10, observamos que o consumo da dieta hipercalórica promoveu redução do colesterol HDL (Figura 10A), aumento do colesterol LDL (Figura 10B), aumento do colesterol total (Figura 10C) e aumento dos níveis de triglicérides (Figura 10D). Embora o tratamento farmacológico com nebivolol não tenha revertido a redução do colesterol HDL, a terapia medicamentosa foi eficaz em reverter as demais alterações do perfil lipídico.

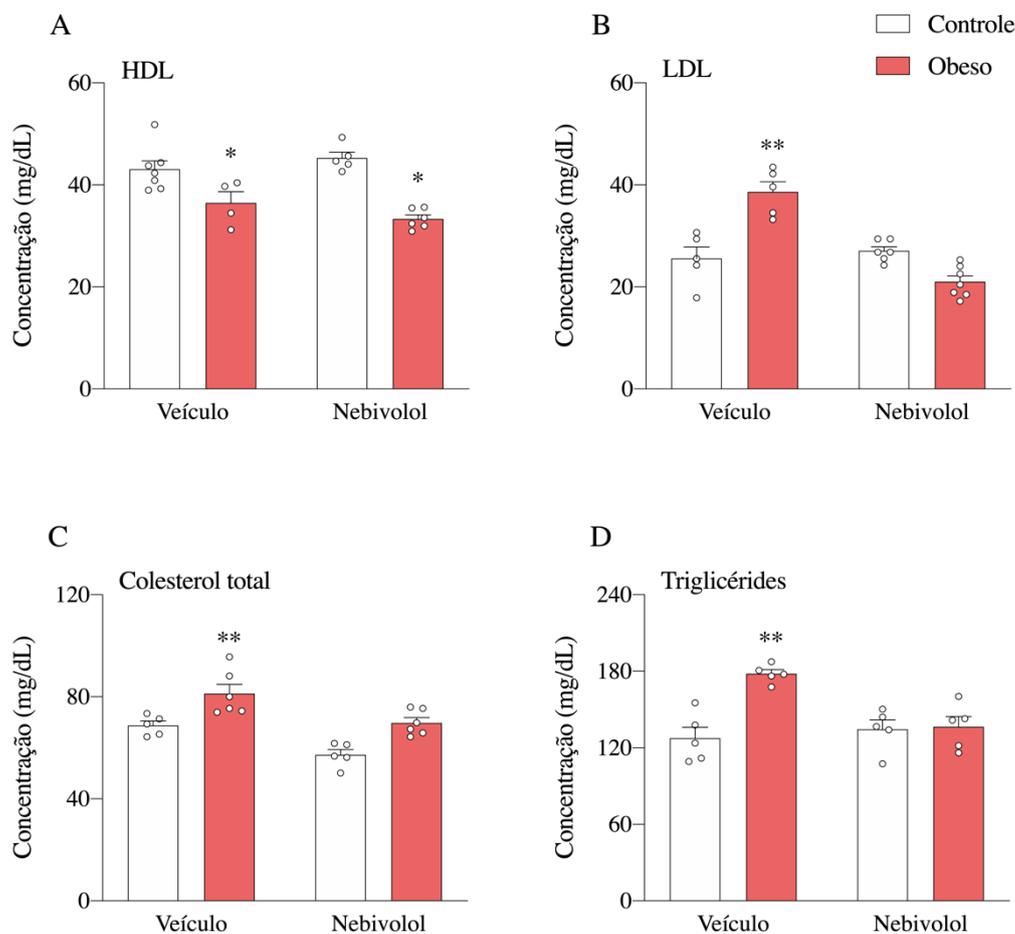


Figura 10. Avaliação do perfil lipídico dos animais. Ao final do tratamento foi avaliado o colesterol HDL (A), colesterol LDL (B), colesterol total (C) e triglicérides (D). Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-8$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle e nebivolol; **Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol. ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.1.6. Avaliação do perfil glicêmico e função renal

Outro fator associado ao desenvolvimento da síndrome metabólica é o nível elevado de açúcar no sangue. Portanto, a glicemia foi avaliada no plasma de animais após jejum de 12 horas. Na Figura 11A observamos que o tratamento com dieta hipercalórica não promoveu alteração na glicemia dos animais e o nebivolol não teve participação nesse parâmetro.

Além dos impactos cardiometabólicos induzidos pela obesidade apresentados, evidências da literatura indicam uma relação direta entre a obesidade e o desenvolvimento de doença renal crônica. Nesse sentido, para avaliar a correlação entre a obesidade e disfunção renal, quantificamos os níveis plasmáticos de Na^+ , K^+ e creatinina para inferência sobre a função renal. Nas Figuras 11B-D observamos que o consumo da dieta hipercalórica aumentou os níveis plasmáticos de todos os parâmetros analisados, demonstrando que o impacto direto da obesidade sobre a função renal, e que o tratamento farmacológico com o nebivolol reverteu essas alterações.

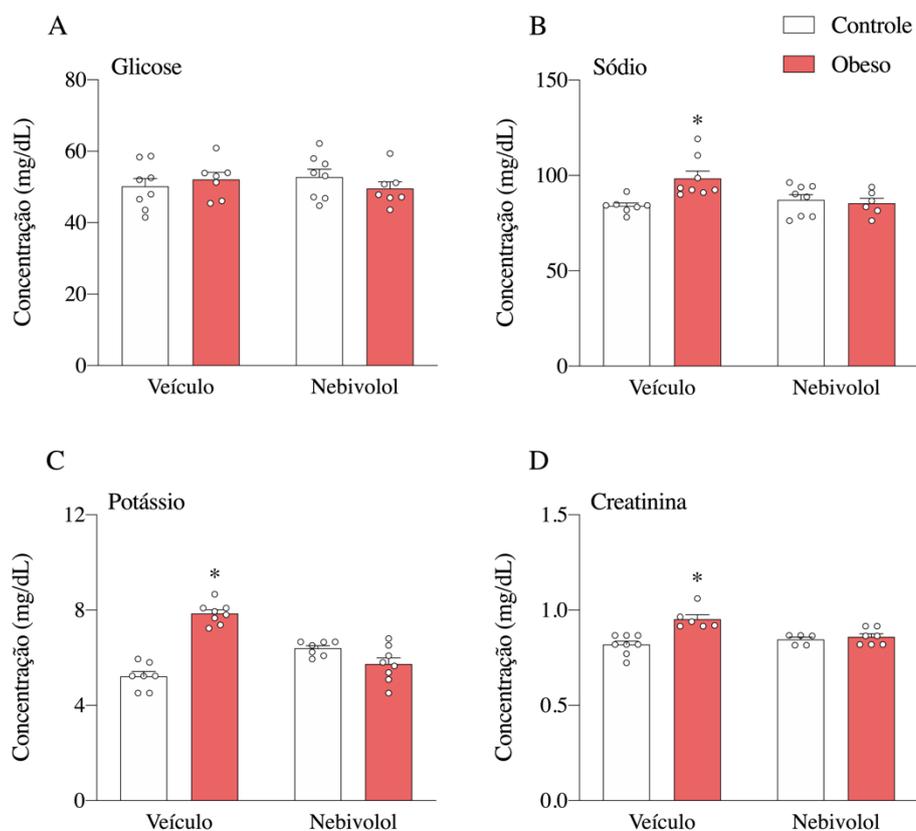


Figura 11. Efeito da obesidade sobre os níveis plasmáticos de glicemia, sódio, potássio e creatinina. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=6-8$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2. Estudo funcional da reatividade vascular em artérias mesentéricas

5.2.1. Efeito da obesidade sobre a contração vascular induzida pelo KCl

Após validar nosso modelo de obesidade, nosso primeiro objetivo foi confirmar que a obesidade pode causar disfunção vascular e investigar se o tratamento com nebivolol poderia reverter essa alteração. Utilizamos preparações de artérias mesentéricas em miógrafos de arame, com ou sem o PVAT.

Nas artérias com PVAT, a obesidade aumentou a resposta contrátil ao KCl, e o tratamento com nebivolol reverteu essa resposta (Figura 12A). No entanto, nas artérias sem PVAT, a obesidade não afetou a resposta contrátil ao KCl (Figura 12B). Isso confirma que a obesidade de fato prejudica a função do PVAT, levando a uma perda do seu efeito anti-contrátil e à aquisição de um efeito pró-contrátil. Além disso, demonstramos que o tratamento com nebivolol pode reverter essa mudança funcional do PVAT.

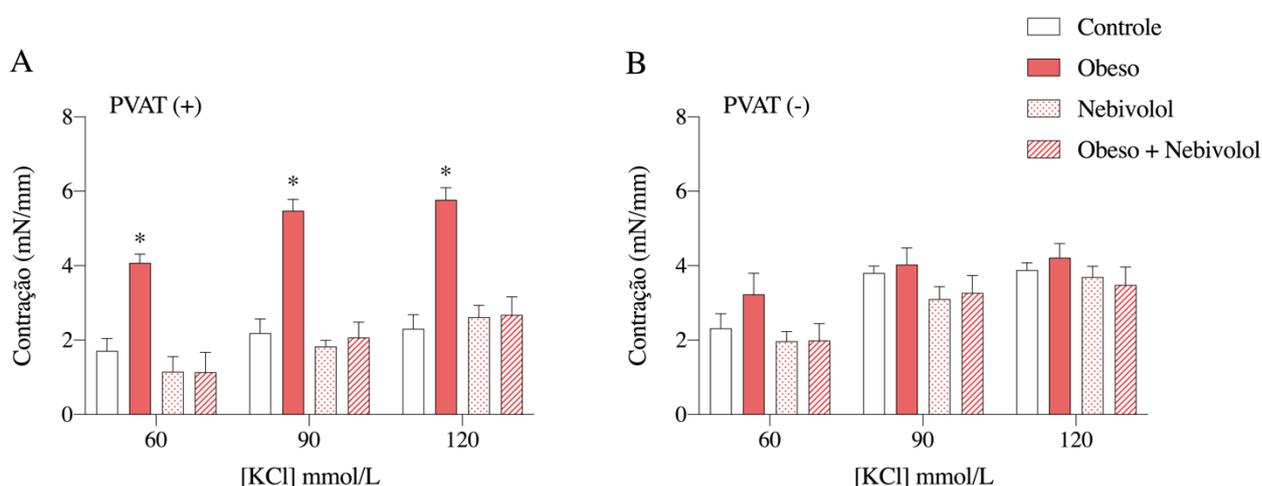


Figura 12. Efeito da obesidade e nebivolol na contração vascular induzida por KCl em artérias mesentéricas com [PVAT(+)] e sem [PVAT(-)] PVAT. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-7$ animais por grupo. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.2. Efeito da obesidade sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina

Em seguida, investigamos a resposta contrátil das artérias mesentéricas à fenilefrina, considerando a presença ou ausência do PVAT. No grupo controle, a retirada do PVAT resultou em aumento na potência e na resposta máxima à fenilefrina, evidenciando o papel anti-contrátil do PVAT (Figura 13A). Por outro lado, em animais obesos, as artérias com PVAT apresentaram uma curva semelhante às artérias sem PVAT do grupo controle, além de uma resposta máxima ainda maior. Isso sugere que, na obesidade, o PVAT não apenas perde seu efeito anti-contrátil, mas também adquire características pró-contráteis. Entretanto, ao examinarmos as artérias de animais obesos tratados com nebivolol (Figura 13B), observamos a restauração do padrão de resposta. O tratamento com nebivolol conseguiu reverter o efeito anti-contrátil perdido do PVAT devido à obesidade. Na Tabela 1 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para a fenilefrina em artérias PVAT (-) e PVAT (+).

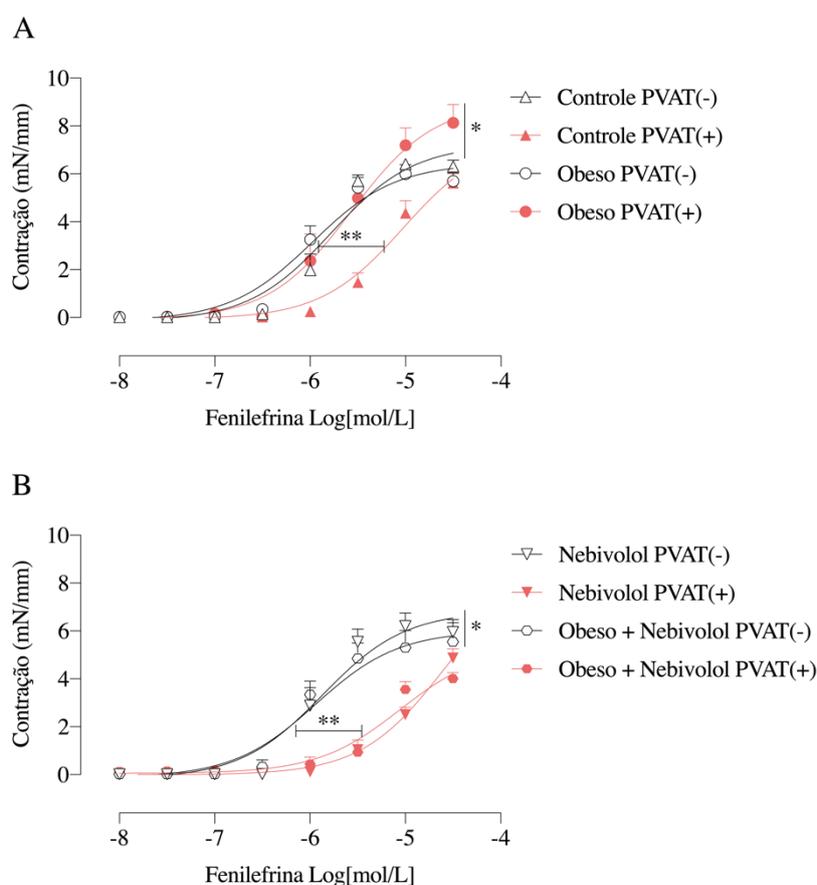


Figura 13. Efeito da obesidade e nebivolol na contração induzida pela fenilefrina em artérias mesentéricas sem [PVAT(-)] e com [PVAT(+)] PVAT. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-7$ animais por grupo. *Corresponde à alteração de E_{max} ; **Corresponde à alteração de pD_2 ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

Tabela 1. Valores de E_{max} (mN/mm) e pD_2 para fenilefrina em artérias mesentéricas na ausência [PVAT (-)] e presença [PVAT (+)] do PVAT.

	PVAT (-)		PVAT (+)	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	$6,3 \pm 0,3^a$ (6)	$5,9 \pm 0,1^a$	$5,6 \pm 0,4$ (7)	$5,0 \pm 0,1$
Obeso	$5,7 \pm 0,4^a$ (5)	$6,0 \pm 0,1^a$	$8,1 \pm 0,8^b$ (7)	$5,6 \pm 0,1^b$
Nebivolol	$6,0 \pm 0,5^a$ (8)	$5,8 \pm 0,1^a$	$4,9 \pm 0,4$ (7)	$4,6 \pm 0,1^b$
Obeso + Nebivolol	$5,5 \pm 0,8^a$ (6)	$5,9 \pm 0,1^a$	$4,0 \pm 0,2$ (6)	$5,1 \pm 0,1$

Os valores representam a média \pm EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aComparado ao respectivo grupo PVAT(+); ^bComparado aos grupos controle e obeso+neбиволol PVAT(+) ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.3. Papel das ERO na disfunção vascular em artérias mesentéricas

Em relação aos fatores pró-contráteis originados do PVAT e associados ao aumento da resposta contrátil na obesidade, destaca-se o papel do $O_2^{\cdot-}$. Essa espécie também desempenha um papel na perda do efeito anti-contrátil do PVAT em outras situações fisiopatológicas. Utilizamos o tiron como ferramenta para neutralizar o $O_2^{\cdot-}$ e investigar seus efeitos.

Observamos que o sequestro do $O_2^{\cdot-}$ pelo tiron restaurou a resposta máxima de contração e a potência da fenilefrina em artérias com PVAT de animais obesos, mas não teve efeito significativo nas preparações sem PVAT (Figuras 14A-B). Isso sugere que o aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ pelo PVAT em animais obesos contribui para a disfunção do PVAT associada à obesidade.

Por outro lado, nas artérias de animais obesos tratados com nebivolol, a incubação com tiron manteve um perfil de contração similar ao das artérias de animais alimentados com dieta padrão, tanto com quanto sem PVAT. Esse resultado sugere que o nebivolol pode atenuar os efeitos negativos do aumento do $O_2^{\cdot-}$ no PVAT associado à obesidade (Figuras 14C-D).

Na Tabela 2 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para a fenilefrina em artérias PVAT(-) e PVAT (+) na presença do tiron, respectivamente.

Dentre as fontes produtoras de $O_2^{\cdot-}$, destaca-se o complexo da NADPH oxidase, uma vez que este é o único sistema cujo foco é a produção do $O_2^{\cdot-}$. Para avaliar esse sistema, usamos o método da quimioluminescência da lucigenina. Quando o $O_2^{\cdot-}$ é produzido, ele interage com a lucigenina, gerando luz. Para identificar a participação da NADPH oxidase nesse processo, adicionamos NADPH, que faz com que a reação ocorra mais pela via da NADPH oxidase do que por outras fontes de superóxido.

Nesse sentido, observamos que a obesidade aumentou a quimioluminescência da lucigenina, tanto no PVAT, quanto no LAM. Essas respostas foram revertidas pelo tratamento com o nebivolol (Figuras 14E-F). Assim, durante a obesidade é observada uma maior atividade do complexo da NADPH oxidase, aumentando a produção de $O_2^{\cdot-}$. No entanto, o tratamento com o nebivolol é capaz de reverter essa produção aumentada do radical aniônico, evidenciando seu efeito antioxidante.

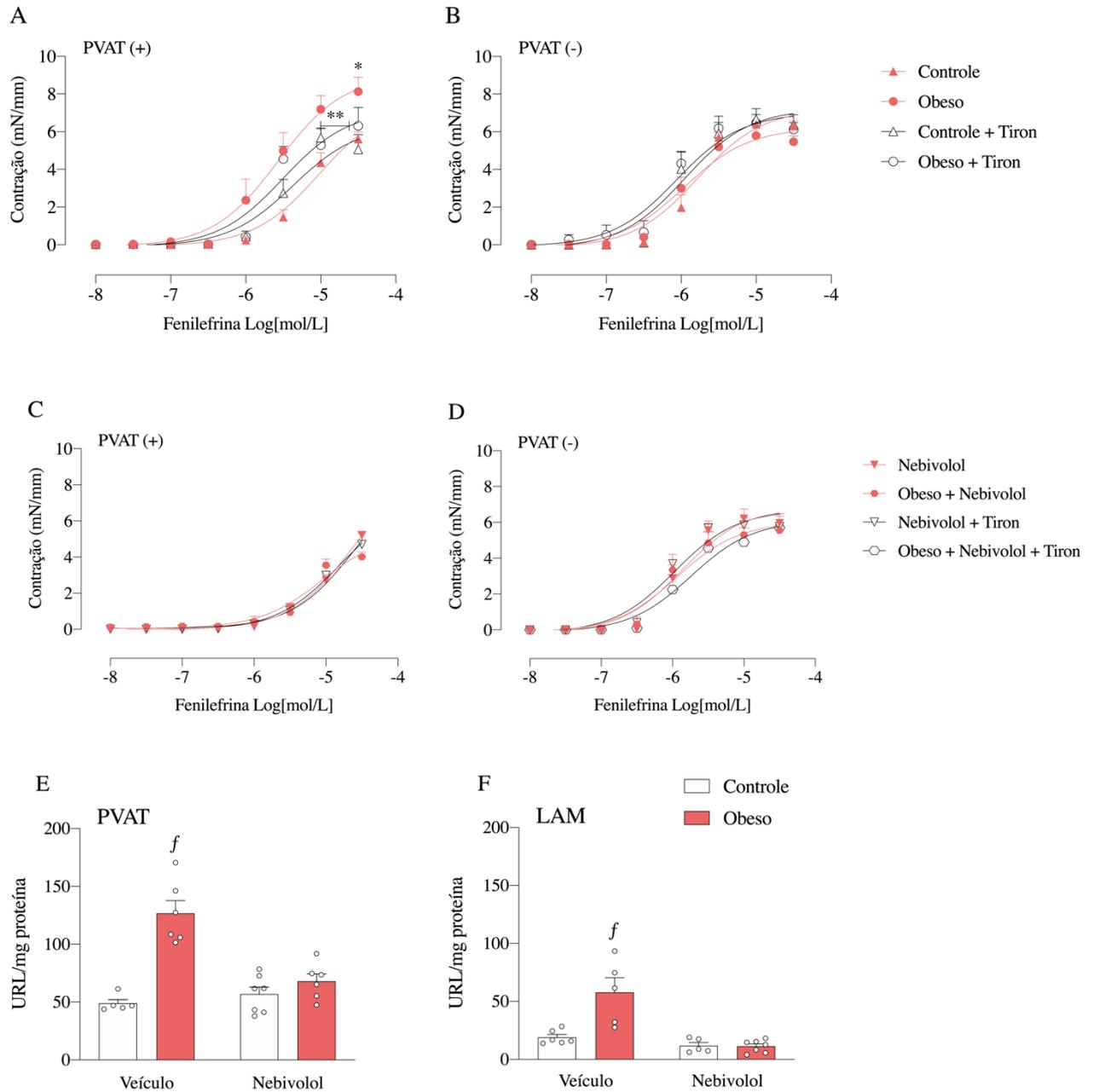


Figura 14. Efeito da obesidade e nebivolol na contração induzida pela fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos sem [PVAT(-)] e com [PVAT(+)] PVAT na presença do tiron (1 mmol/L) e a produção de $O_2^{\bullet-}$ no PVAT e LAM. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de n=5-7 animais por grupo. *Corresponde à alteração de E_{max} ; **Corresponde à alteração de pD_2 ; ^fComparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

Tabela 2. Valores de E_{max} (mN/mm) e pD_2 para fenilefrina em artérias mesentéricas na ausência [PVAT (-)] e presença [PVAT (+)] do PVAT na presença do Tiron.

PVAT (-)				
	Inibidor ausente		Tiron (1 mmol/L)	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	6,3 ± 0,3 (6)	5,9 ± 0,1	7,0 ± 0,5 (7)	5,9 ± 0,1
Obeso	5,7 ± 0,4 (5)	6,0 ± 0,1	6,1 ± 0,4 (6)	6,1 ± 0,1
Nebivolol	6,0 ± 0,5 (8)	5,8 ± 0,1	5,8 ± 0,4 (6)	6,0 ± 0,1
Obeso + Nebivolol	5,5 ± 0,8 (6)	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,8 (5)	5,7 ± 0,1

PVAT (+)				
	Inibidor ausente		Tiron (1 mmol/L)	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	5,6 ± 0,4 (7)	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,8 (7)	5,4 ± 0,1
Obeso	8,1 ± 0,8 ^a (7)	5,6 ± 0,1 ^b	6,3 ± 0,9 (5)	5,5 ± 0,1
Nebivolol	4,9 ± 0,4 (7)	4,6 ± 0,1 ^b	4,6 ± 0,5 (5)	4,7 ± 0,1 ^b
Obeso + Nebivolol	4,0 ± 0,2 (6)	5,1 ± 0,1	4,9 ± 0,4 (5)	4,6 ± 0,2 ^b

Os valores representam a média ± EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aComparado aos grupos controle, neбиволol e obeso+neбиволol PVAT (+). ^bComparado ao grupo controle PVAT (+). ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.3.1. Determinação da atividade total da SOD

Para controlar os níveis de $O_2^{\cdot-}$, o organismo dispõe de três isoformas da SOD, enzimas responsáveis pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o a uma espécie neutra e não radicalar, o H_2O_2 .

Nesse sentido, avaliamos a atividade total dessas enzimas utilizando um kit colorimétrico. Nossos achados apontam que, enquanto no PVAT a atividade da SOD se manteve inalterada após, tanto a indução de obesidade, quanto o tratamento com o nebivolol (Figura 15A), no LAM, a obesidade reduziu a atividade da SOD. Além disso, o tratamento com o nebivolol aumentou a atividade nos animais que receberam dieta padrão e normalizou a atividade nos animais obesos (Figura 15B).

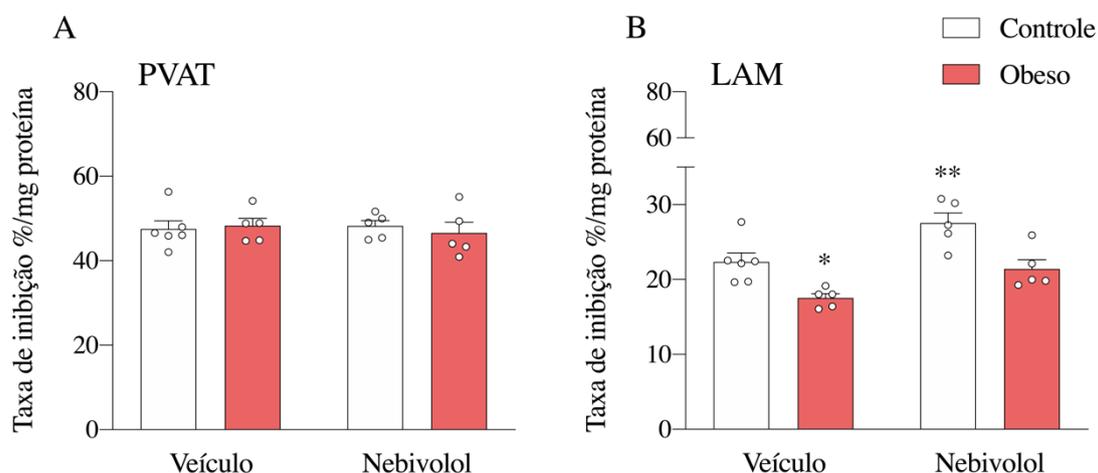


Figura 15. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a atividade da SOD no PVAT e LAM. A atividade da SOD foi avaliada no PVAT (A) e no LAM (B) colorimetricamente. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-7$. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol; **Comparado aos grupos controle, obeso e obeso+nebivolol ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.3.2. Determinação dos níveis de H_2O_2

Como mencionado anteriormente, o produto da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ é o H_2O_2 , uma espécie neutra e não radicalar. Vale ressaltar também que o H_2O_2 também é uma espécie vasoativa e que, a depender da concentração e leito vascular analisado, pode desempenhar papel vasorrelaxante ou contrátil. Para avaliar os níveis dessa espécie, utilizamos um kit fluorimétrico e observamos que a obesidade reduziu os níveis de H_2O_2 e o tratamento com nebivolol restaurou aos níveis basais no PVAT (Figuras 16A). Por outro lado, no LAM a obesidade não alterou os níveis de H_2O_2 e o tratamento com nebivolol aumentou a concentração dessa espécie em animais alimentados com dieta padrão (Figura 16B).

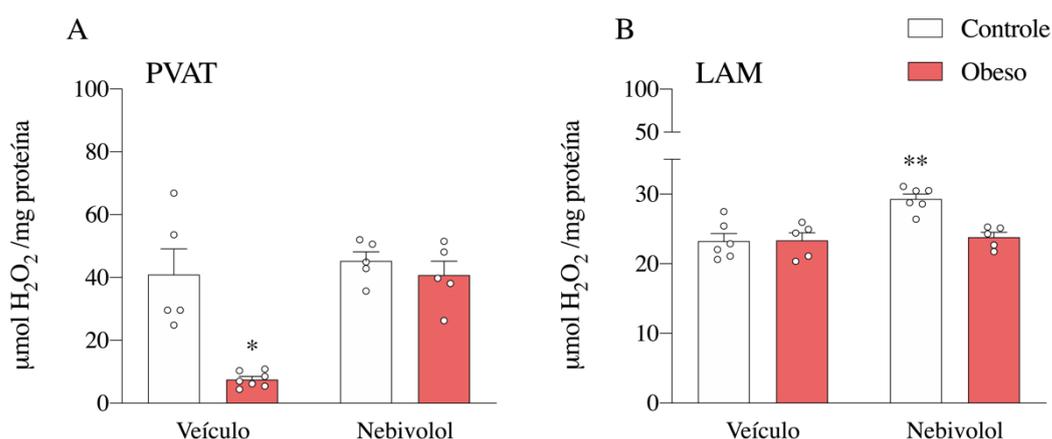


Figura 16. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre os níveis de H_2O_2 em PVAT e LAM. Os níveis de H_2O_2 foram avaliados no PVAT (A) e no LAM (B) por fluorimetria utilizando substrato fluorogênico. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-8$. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol; **Comparado aos grupos controle, obeso e obeso+nebivolol ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.3.3. Determinação da atividade da catalase

A estabilidade do H_2O_2 faz com que essa ERO tenha um tempo maior de circulação pelo organismo se comparada ao $O_2^{\cdot-}$. Para controlar os níveis dessa espécie, o organismo dispõe de peroxidases, sendo a catalase uma das enzimas que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 .

Nesse sentido, avaliamos a atividade enzimática da catalase e observamos que no PVAT, a atividade da catalase se manteve inalterada após a indução de obesidade, porém o tratamento com o nebivolol a aumentou em animais tratados com dieta padrão (Figura 17A). No LAM, a obesidade reduziu a atividade da catalase e o tratamento com o nebivolol reverteu tal alteração (Figura 17B). Dessa forma, observamos que há divergências no padrão de respostas ao quadro de obesidade a depender do tipo de tecido estudado.

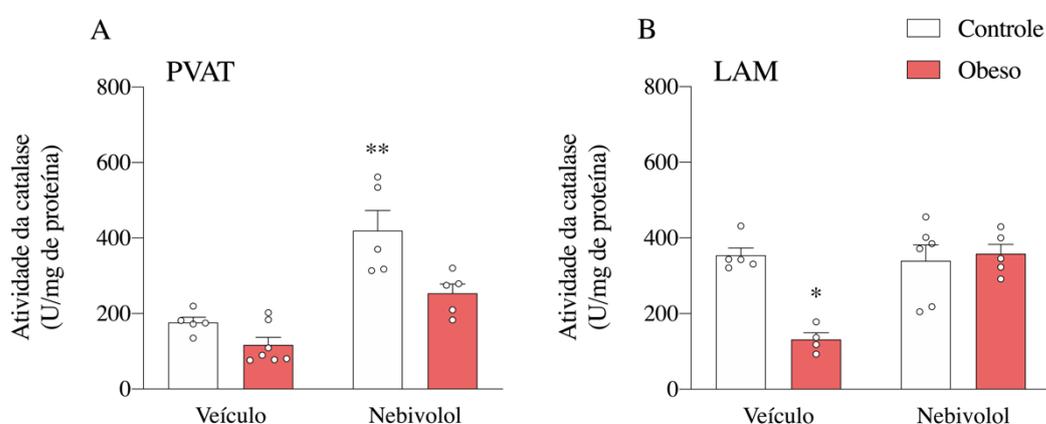


Figura 17. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a atividade da catalase no PVAT e LAM. A atividade da catalase foi avaliada no PVAT (A) e no LAM (B) colorimetricamente. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-7$. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol; **Comparado aos grupos controle, obeso e obeso+nebivolol ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.3.4. Determinação dos níveis de Malondialdeído (MDA)

O *burst oxidativo* pode levar ao aumento da peroxidação dos lipídeos de membrana, causando mudanças na permeabilidade e fluidez das membranas. Uma maneira de medir isso é quantificando as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são produtos da peroxidação lipídica, incluindo o MDA. Nesse sentido, avaliamos os níveis de MDA e observamos que a obesidade aumentou os níveis de MDA e o tratamento com nebivolol restaurou aos níveis basais, tanto no PVAT, quanto no plasma (Figuras 18A-C). No entanto, no LAM a obesidade não alterou os níveis de MDA (Figura 18B).

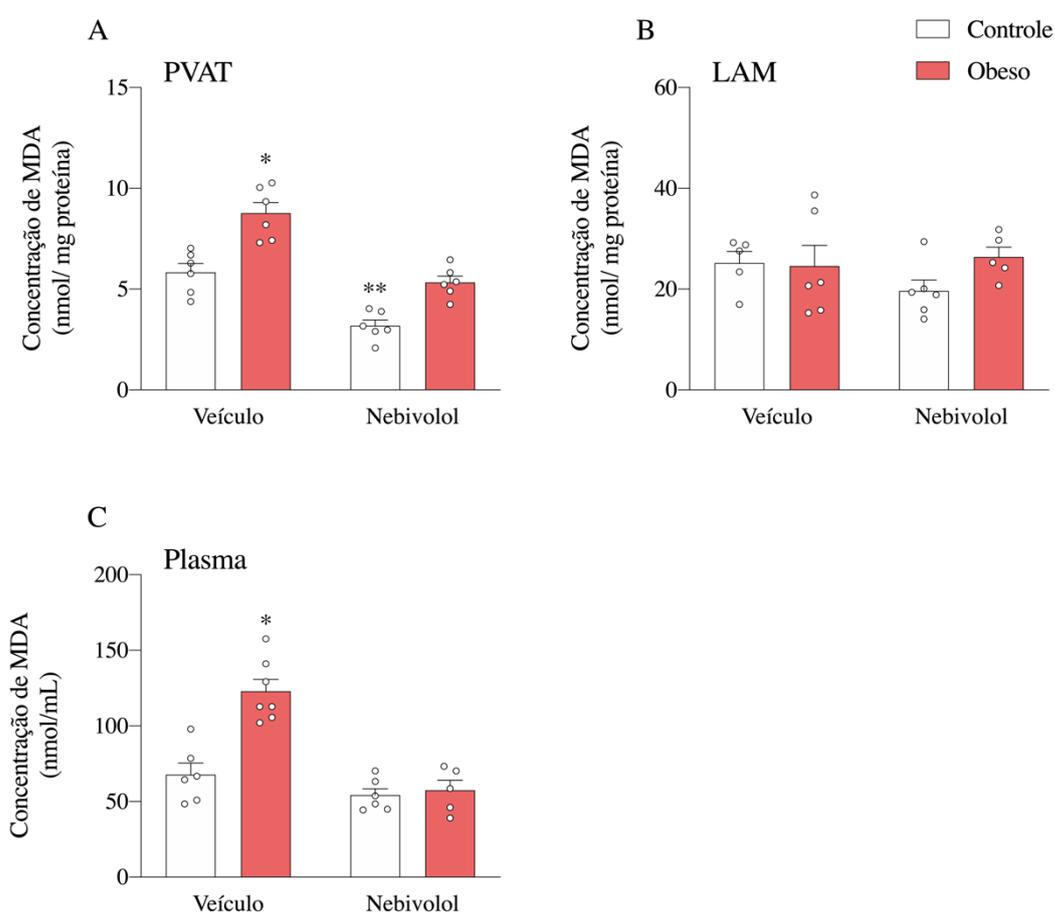


Figura 18. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre os níveis de MDA em PVAT, LAM e plasma. Os níveis de MDA foram avaliados no PVAT (A), no LAM (B) e no plasma (C) por colorimetria. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=5-7$. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol; **Comparado aos grupos controle, obeso e obeso+nebivolol ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.4. Envolvimento da via nitrérgica no efeito da obesidade em artérias mesentéricas

Além de aumentar a produção de fatores contráteis, como o $O_2^{\cdot-}$, a obesidade também pode reduzir a produção de fatores relaxantes, como o NO. Investigamos a influência do NO na resposta contrátil para a fenilefrina em artérias mesentéricas com e sem o PVAT.

O uso do inibidor não seletivo das isoformas da enzima NOS, L-NAME, resultou em aumento na resposta máxima de contração nas artérias com PVAT, assim como no aumento da potência da fenilefrina em artérias controle (Figura 19A). Nas artérias PVAT(+) de animais obesos, a incubação com L-NAME não alterou a potência da fenilefrina, mas aumentou a resposta contrátil máxima, indicando a participação parcial da via nitrérgica na disfunção vascular associada à obesidade. Adicionalmente, o L-NAME aumentou a resposta contrátil nas artérias PVAT (+) dos grupos de animais tratados com nebivolol (Figura 19C). No entanto, não houve alteração significativa nos efeitos máximos e na potência da fenilefrina em artérias PVAT (-) nos grupos controle, obeso, nebivolol e obeso + nebivolol (Figuras 19B-D).

Na tabela 3 estão representados os valores de E_{max} e pD_2 para a fenilefrina em artérias PVAT (-) e PVAT (+) na presença do tiron, respectivamente.

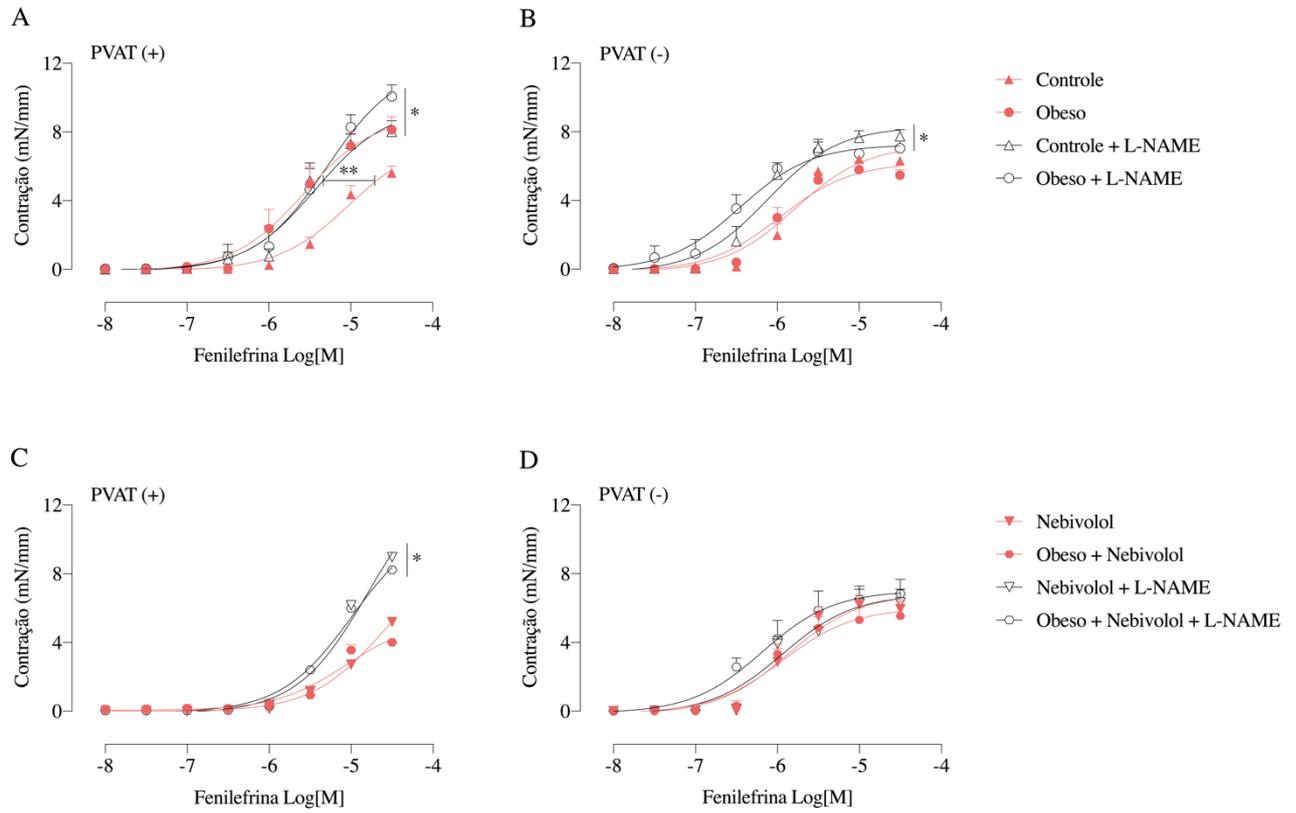


Figura 19. Efeito da obesidade e nebivolol na contração induzida pela fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos sem [PVAT (-)] e com [PVAT (+)] PVAT na presença do L-NAME (100 μ mol/L). Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de n=5-7 animais por grupo. *Corresponde à alteração de E_{max}; **Corresponde à alteração de pD₂ (p<0,05, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

Tabela 3. Valores de E_{max} (mN/mm) e pD_2 para fenilefrina em artérias mesentéricas na ausência [PVAT (-)] e presença [PVAT (+)] do PVAT na presença do L-NAME.

PVAT (-)				
	Inibidor ausente		L-NAME (100 μ mol/L)	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	6,3 \pm 0,3 (6)	5,9 \pm 0,1	7,3 \pm 0,4 (7)	6,1 \pm 0,1
Obeso	5,7 \pm 0,4 (5)	6,0 \pm 0,1	6,2 \pm 0,4 (6)	6,3 \pm 0,1
Nebivolol	6,0 \pm 0,5 (8)	5,8 \pm 0,1	5,2 \pm 0,7 ^b (7)	6,0 \pm 0,1
Obeso + Nebivolol	5,5 \pm 0,8 (6)	5,9 \pm 0,1	6,2 \pm 0,9 (5)	6,2 \pm 0,2

PVAT (+)				
	Inibidor ausente		L-NAME (100 μ mol/L)	
	E_{max}	pD_2	E_{max}	pD_2
Controle	5,6 \pm 0,4 (7)	5,0 \pm 0,1	8,0 \pm 0,6 (7)	5,4 \pm 0,1
Obeso	8,1 \pm 0,8 ^a (7)	5,6 \pm 0,1 ^b	10,1 \pm 0,7 (5)	5,3 \pm 0,1
Nebivolol	4,9 \pm 0,4 (7)	4,6 \pm 0,1 ^b	8,3 \pm 1,1 (6)	4,7 \pm 0,1 ^b
Obeso + Nebivolol	4,0 \pm 0,2 (6)	5,1 \pm 0,1	7,5 \pm 1,3 (5)	4,7 \pm 0,2 ^b

Os valores representam a média \pm EPM dos diferentes grupos experimentais; os números entre parênteses representam o n de cada grupo experimental; ^aComparado aos grupos controle, neбиволol e obeso+neбиволol PVAT (+). ^bComparado ao grupo controle. ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.2.4.1. Dosagem de NO_2^-

Após confirmarmos o papel da via nitrérgica na disfunção vascular relacionada à obesidade, investigamos se a obesidade afeta a disponibilidade do óxido nítrico (NO). Dado que o NO é um gás, métodos indiretos são usados para medir seus níveis, como a quantificação de nitrato/nitrito. Nesse contexto, medimos os níveis de nitrito através do método colorimétrico de Griess e os comparamos com uma curva padrão de nitrito.

Nossos resultados demonstram que a obesidade reduziu os níveis de NO_2^- e o tratamento com neбиволol restaurou aos níveis basais, tanto no PVAT, quanto no plasma (Figuras 20A-C). Além disso, o tratamento com neбиволol aumentou a concentração plasmática dessa espécie em animais alimentados com dieta padrão. Por outro lado, no LAM a obesidade não alterou os níveis de NO_2^- . (Figura 20B).

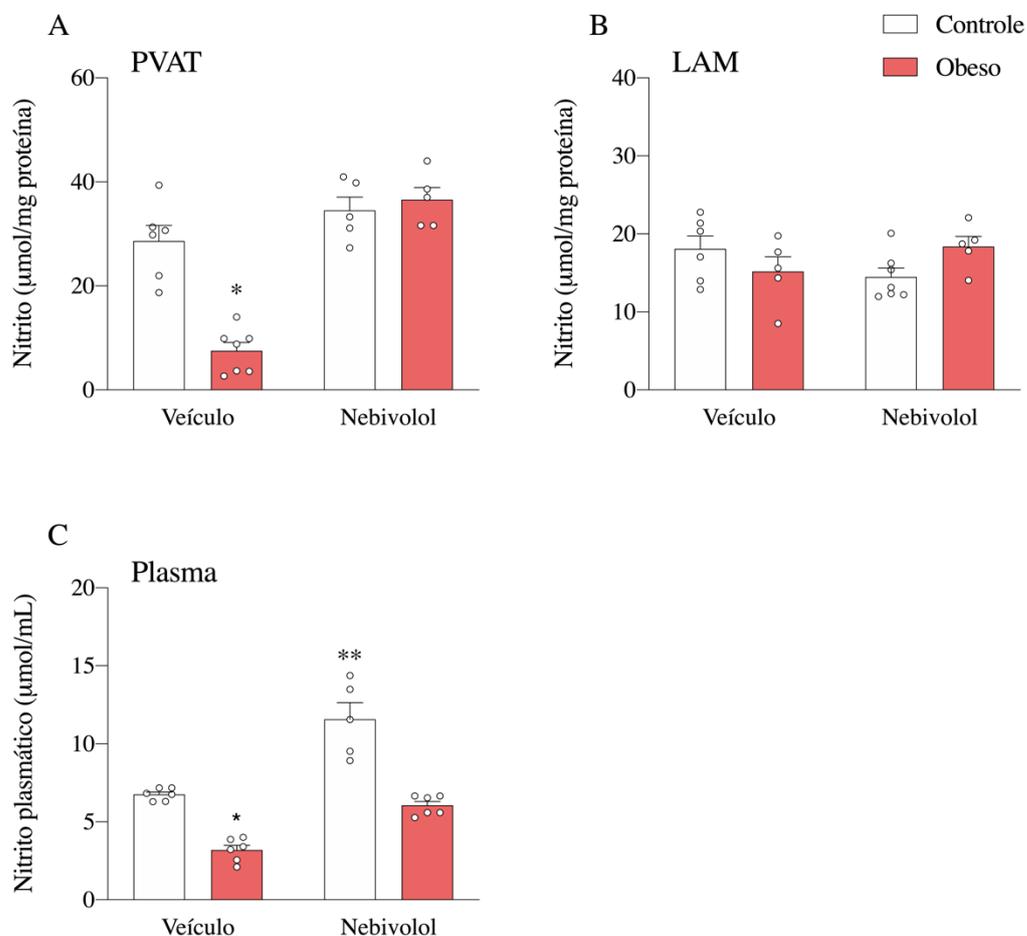


Figura 20. Efeitos da obesidade e neбиволol sobre os níveis de NO_2^- em PVAT, LAM e plasma. Os níveis de NO_2^- foram avaliados no PVAT (A), no LAM (B) e no plasma (C) por colorimetria. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de n=5-7. *Comparado aos grupos controle, neбиволol e obeso+neбиволol; **Comparado aos grupos controle, obeso e obeso+neбиволol ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.3. Avaliação de mediadores pró-inflamatórios PVAT e LAM

5.3.1. Avaliação da atividade da MPO e da NAG

A inflamação associada à obesidade é conhecida como uma inflamação estéril, ou seja, uma meta-inflamação. Isso ocorre porque não é desencadeada por um agente infeccioso específico, mas sim por um estado sistêmico. Durante o desenvolvimento da obesidade, mudanças no tecido adiposo ocorrem devido a essa meta-inflamação, incluindo a presença de células do sistema imunológico. Os neutrófilos, como primeira linha de defesa do corpo, são recrutados nesse processo. Nesse contexto, investigamos a atividade da enzima MPO, que é abundante nos neutrófilos e catalisa a produção de várias espécies oxidantes.

Nossos resultados demonstram que, tanto no PVAT, quanto no LAM, a obesidade aumentou a atividade da MPO, indicativo de que durante a meta-inflamação há um maior recrutamento de neutrófilos para essas regiões (Figuras 21A-B). No entanto, quando os animais foram tratados com o nebivolol, a atividade da MPO foi reduzida.

Durante a meta-inflamação associada à obesidade, além dos neutrófilos, outras células imunológicas são atraídas para os tecidos, com os macrófagos desempenhando um papel proeminente. Nesse contexto, observa-se um aumento tanto no número total de macrófagos quanto na proporção de macrófagos pró-inflamatórios, conhecidos como macrófagos M1, enquanto os macrófagos anti-inflamatórios, ou M2, tendem a diminuir.

Nesse sentido, para avaliarmos o recrutamento de macrófagos, quantificamos a atividade da NAG através de uma reação colorimétrica e observamos que, tanto no PVAT, quanto no LAM, a obesidade aumentou a atividade da NAG, indicando que há um aumento no recrutamento de macrófagos para esses tecidos durante a obesidade (Figuras 21C-D). No entanto, quando os animais foram tratados com o nebivolol, a atividade da NAG foi reduzida.

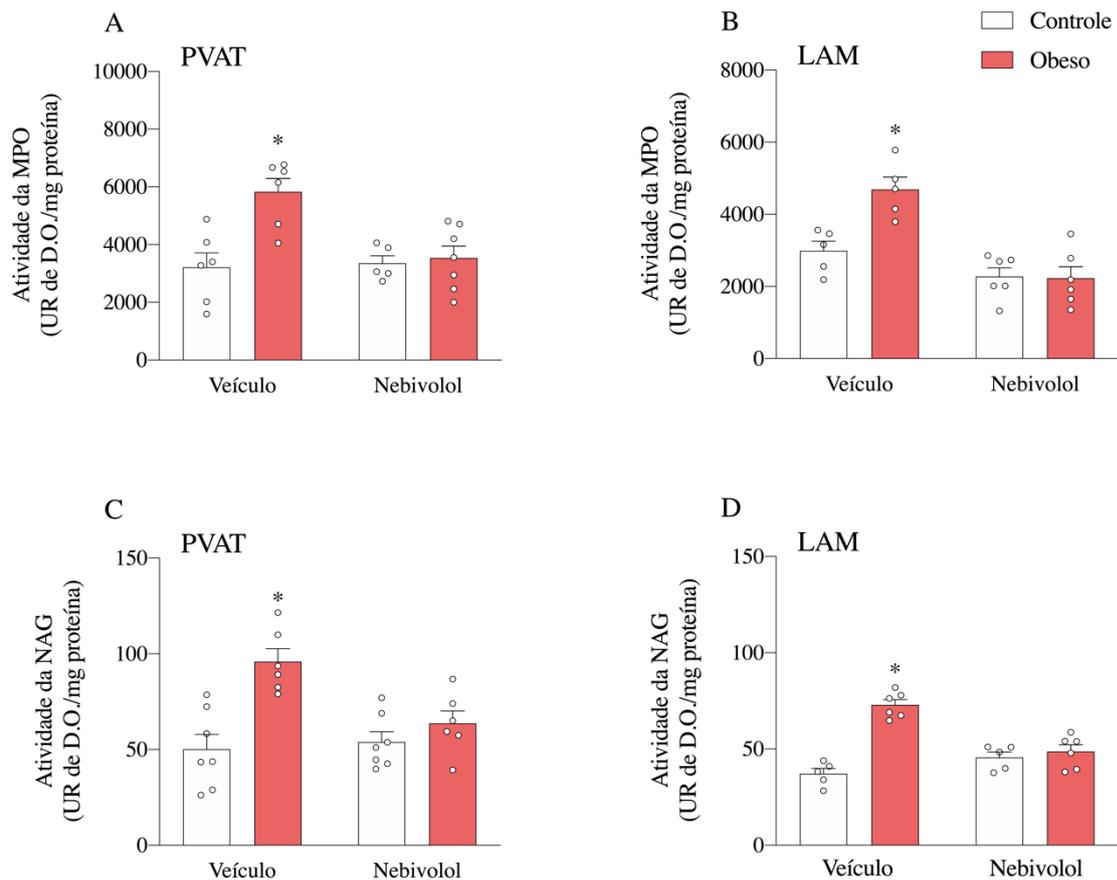


Figura 21. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a atividade da MPO e NAG no PVAT e LAM. As atividades da MPO e NAG foram avaliadas por colorimetria. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=6-7$. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol. ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.3.2. Avaliação do recrutamento de macrófagos no PVAT

A infiltração de macrófagos no PVAT é um fator determinante na produção de citocinas, quimiocinas e outros fatores participantes da meta-inflamação associada à obesidade. Nesse contexto, caracterizamos os macrófagos recrutados para o PVAT a partir da digestão enzimática do tecido e marcação com anticorpos para as seguintes moléculas de superfície: CD45, CD11b, CD68 e RT1B.

Nossos dados demonstram que nos animais obesos há um aumento no número de macrófagos expressando $CD45^+CD11b^+CD68^+RT1B$, sendo o RT1B um marcador de ativação (Figura 22A). Além disso, observamos também que a obesidade promove aumento no número de células $CD45^+CD11b^+CD68^+$ no PVAT (Figuras 22B-C). Assim, evidenciamos que a obesidade promove aumento do recrutamento e ativação de macrófagos para o PVAT, todavia, o tratamento com o nebivolol reverteu estas respostas.

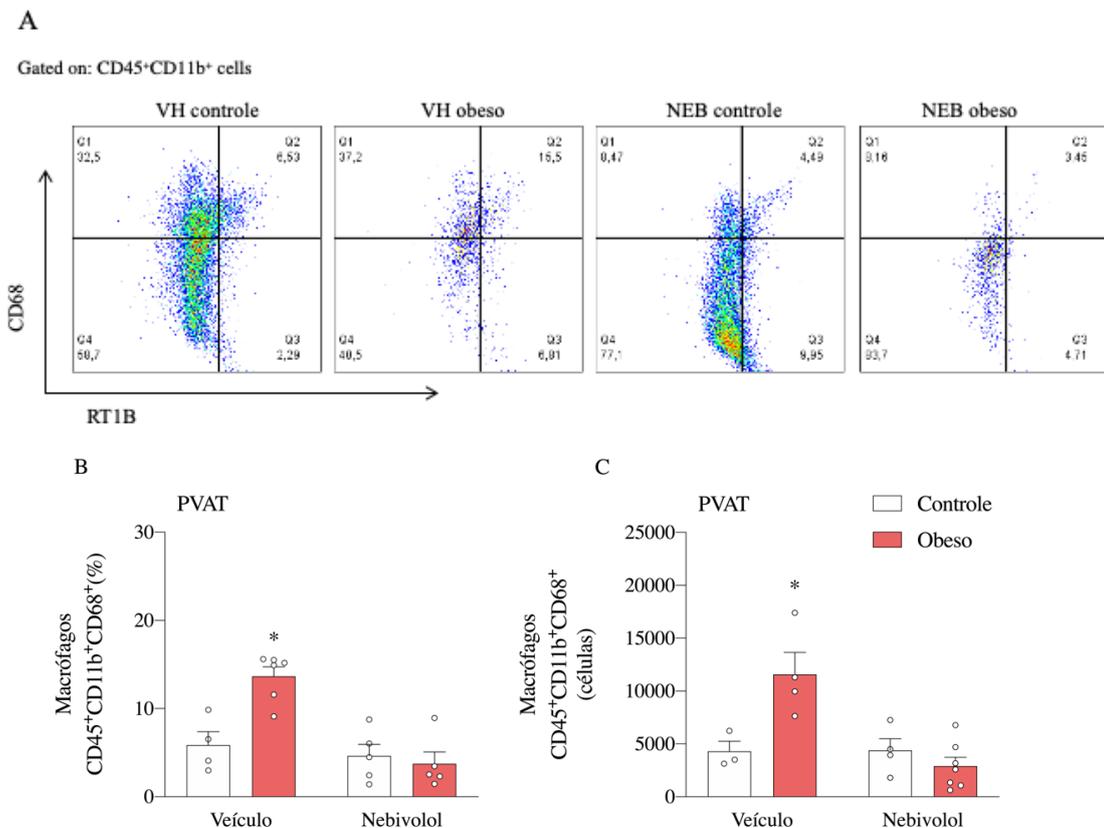


Figura 22. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a população de macrófagos no PVAT. Counterplot representando a frequência e número absoluto de macrófagos expressando $CD45^+CD11b^+CD68^+$ e $CD45^+CD11b^+RT1B$ (A). Frequência (B) e número absoluto de macrófagos (C) expressando $CD45^+CD11b^+CD68^+$. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=4-7$. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol. ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.3.3. Avaliação dos macrófagos produtores de TNF- α no PVAT

Conforme discutido anteriormente, existem macrófagos com características anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, com a capacidade de se converterem entre esses subtipos em resposta a estímulos. No contexto da obesidade, fatores como citocinas pró-inflamatórias e AGL podem incentivar a transformação dos macrófagos para o perfil pró-inflamatório M1. Nesse sentido, investigamos a expressão do TNF- α em macrófagos localizados no PVAT.

Nossos resultados indicam que durante a obesidade há o aumento no número de macrófagos que expressam TNF- α (Figuras 23A-B), resultando em maior fluorescência do marcador intracelular para o TNF- α (Figuras 23C-D). Dessa forma, observamos que a obesidade induz o aumento na população de macrófagos pró-inflamatórios e que o nebivolol foi capaz de exercer efeito anti-inflamatório ao reverter o aumento na expressão de TNF- α nos macrófagos do PVAT.

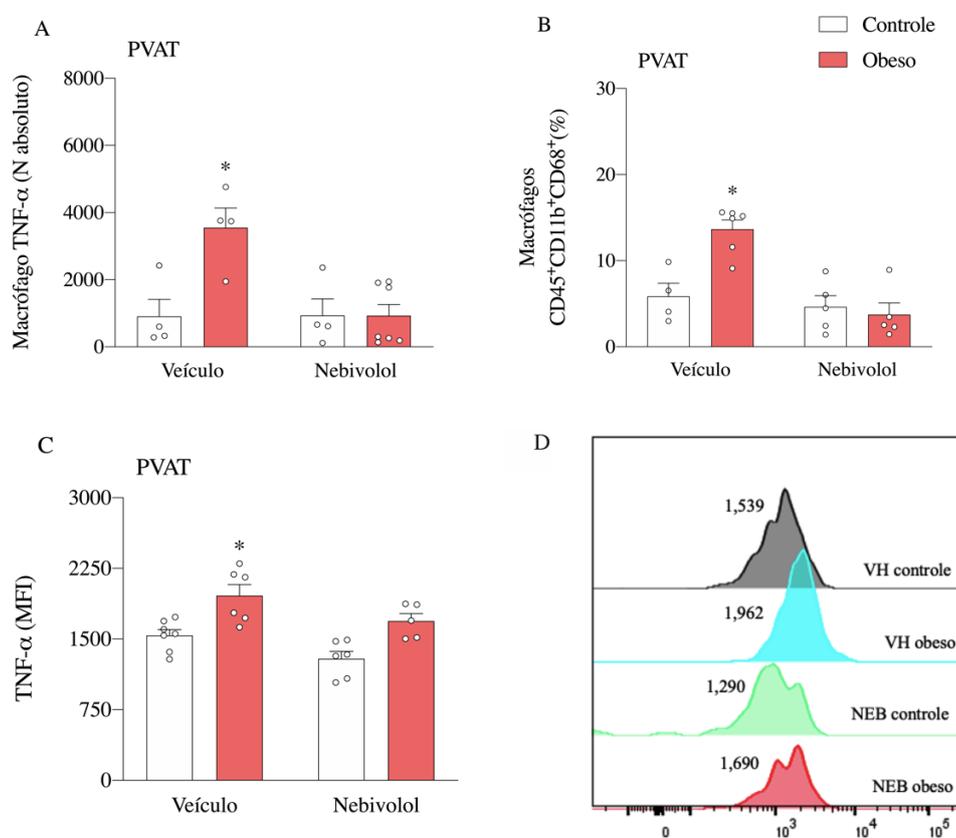


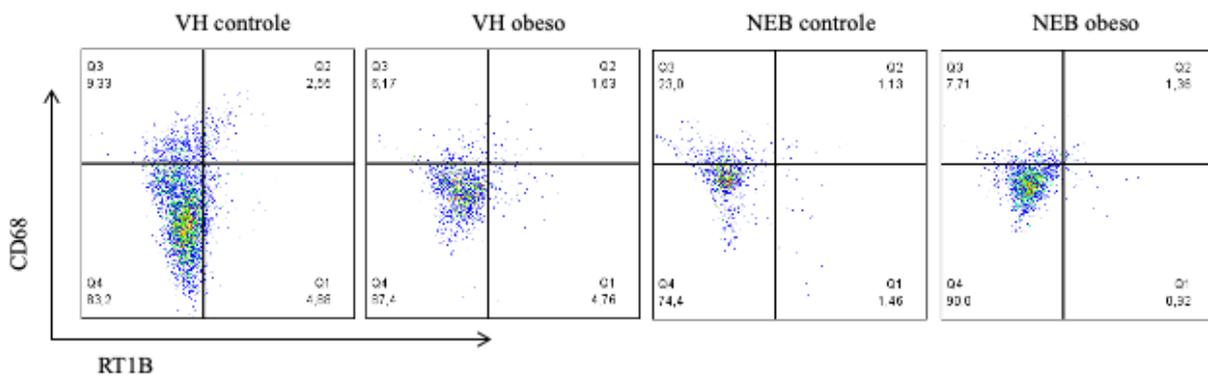
Figura 23. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a expressão de TNF- α em macrófagos do PVAT. A expressão de TNF- α em macrófagos foi avaliada por citometria de fluxo, e representada em número absoluto de células (A), frequência (B) e histograma de fluorescência (C e D). Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de n=4-7. *Comparado aos grupos controle, nebivolol e obeso+nebivolol. ($p < 0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.3.3. Avaliação do recrutamento de macrófagos no LAM

Assim como no PVAT, infiltração de macrófagos no LAM é um fator determinante na produção de fatores que conduzirão a inflamação local. Dessa forma, caracterizamos os macrófagos recrutados para o LAM da mesma forma como feito para o PVAT. Nossos dados demonstram que a obesidade não promoveu aumento, tanto no número de macrófagos ativados ($CD45^+CD11b^+CD68^+RT1B$) (Figura 24A), quanto no número de células $CD45^+CD11b^+CD68^+$ no LAM (Figura 24B). No entanto, observamos que o tratamento farmacológico com nebivolol reduziu o número de células $CD45^+CD11b^+CD68^+$ totais no LAM (Figura 24B).

A

Gated on: $CD45^+CD11b^+$ cells



B

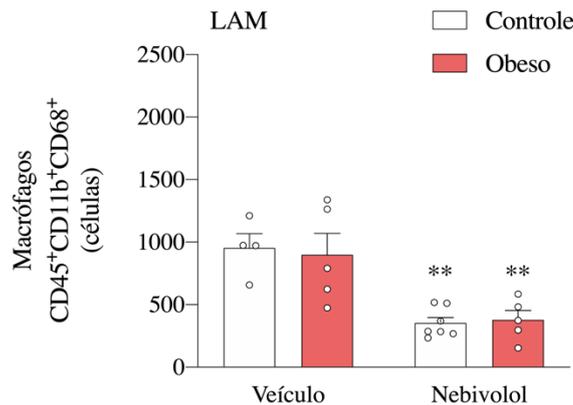


Figura 24. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a população de macrófagos no LAM. Counterplot representando a frequência e número absoluto de macrófagos expressando $CD45^+CD11b^+CD68^+$ e $CD45^+CD11b^+RT1B$ (A). Frequência (B) e número absoluto de macrófagos (C) expressando $CD45^+CD11b^+CD68^+$. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=4-7$. **Comparado aos grupos controle e obeso. ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

5.3.4. Avaliação dos macrófagos produtores de TNF- α no LAM

Semelhantemente ao protocolo realizado para o PVAT, avaliamos a expressão intracelular de TNF- α nos macrófagos presentes no LAM. Nossos resultados indicam que durante a obesidade há o aumento no número de macrófagos que expressam TNF- α (Figuras 25A-B), resultando em maior fluorescência do marcador intracelular para o TNF- α (Figuras 25C-D). No entanto, o tratamento com o nebivolol não foi capaz de reverter o aumento da expressão do TNF- α nesses macrófagos do LAM.

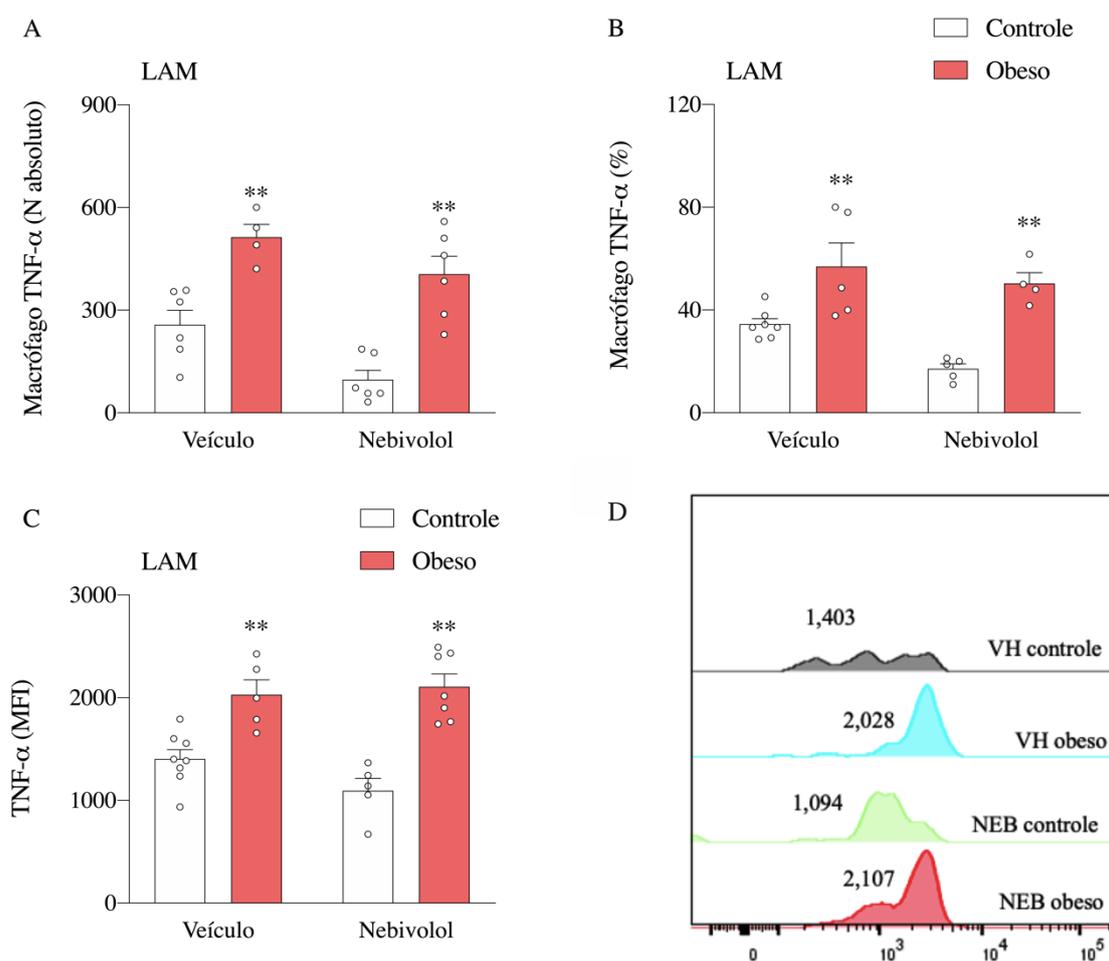


Figura 25. Efeitos da obesidade e nebivolol sobre a expressão de TNF- α em macrófagos do LAM. A expressão de TNF- α em macrófagos foi avaliada por citometria de fluxo, e representada em número absoluto de células (A), frequência (B) e histograma de fluorescência (C e D). Os resultados são apresentados como a média \pm EPM de $n=4-7$. **Comparado aos grupos controle e nebivolol. ($p<0,05$, two-way ANOVA seguida por Bonferroni).

6. Discussão

As lacunas na compreensão dos processos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento de distúrbios cardiometabólicos na síndrome metabólica resultaram na criação de modelos experimentais para estudar a obesidade. Além dos fatores genéticos e sociais, a dieta desempenha um papel crucial na configuração de um ambiente que favorece o acúmulo excessivo de gordura corporal, especialmente através de dietas altamente calóricas ⁹⁸.

Ao replicar o desenvolvimento da obesidade em humanos, observamos que animais submetidos a uma dieta hipercalórica aumentaram sua capacidade de converter calorias em massa, mesmo com uma ingestão de alimentos semelhante aos animais em dieta padrão. Como resultado, os animais obesos apresentaram um maior ganho de peso, principalmente devido ao aumento nos depósitos de gordura em regiões como a epidídima, retroperitônio e mesentério, resultando em um índice de adiposidade elevado em comparação ao índice de animais controle. Nesse sentido, a hipertrofia dos tecidos adiposos analisados pode estar diretamente relacionada a problemas metabólicos significativos ⁹⁹.

A gordura visceral, localizada na cavidade abdominal, desempenha um papel significativo nos distúrbios metabólicos associados à obesidade. Sua atividade hormonal, caracterizada pela secreção de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias contribui para a resistência à insulina, inflamação crônica de baixo grau e disfunção endotelial ¹⁰⁰⁻¹⁰². A produção local de moléculas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, na gordura visceral desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica, que prejudica ainda mais o metabolismo e afeta a função vascular. Além disso, a gordura visceral influencia o sistema nervoso autônomo, aumentando a atividade do sistema nervoso simpático, o que está associado a distúrbios cardiovasculares, como hipertensão arterial ¹⁰³.

Nossos achados revelam uma correlação notável entre o aumento progressivo do ganho de peso e o conseqüente aumento da pressão arterial sistólica em animais submetidos ao modelo experimental de obesidade. Nesse contexto, inúmeros mecanismos podem estar intrincadamente ligados ao desenvolvimento da hipertensão arterial sistólica que surge como uma decorrência da obesidade. Um desses mecanismos é o papel do sistema cardiovascular na regulação da pressão arterial. A obesidade frequentemente

resulta em um aumento do débito cardíaco, impulsionado por um incremento no volume de sangue e uma elevação da frequência cardíaca^{104,105}. Além disso, o aumento observado no volume de sangue no ventrículo esquerdo durante a fase de repouso na obesidade é frequentemente interpretado como evidência de uma capacidade aprimorada de adaptação às variações na quantidade de sangue pré-carga (fenômeno conhecido como mecanismo de Frank-Starling), o que pode levar à dilatação da câmara ventricular. A dilatação da câmara ventricular pode aumentar o estresse nas paredes do coração, predispondo ao aumento da massa do miocárdio e, finalmente, à hipertrofia ventricular esquerda, caracteristicamente do tipo excêntrico.

Em humanos e na maioria dos modelos animais, o desenvolvimento da obesidade não apenas resulta no aumento dos depósitos de gordura nas áreas tradicionais do tecido adiposo, mas também na significativa acumulação de lipídios em outros órgãos. Conforme ocorre o acúmulo de gordura, a deposição de lipídios pode impactar adversamente o funcionamento de tecidos e órgãos de duas maneiras principais: (1) O aumento no tamanho dos depósitos de gordura ao redor de órgãos críticos pode provocar alterações na função desses órgãos, seja devido à compressão física direta ou devido à capacidade das células de gordura ao redor deles de liberar diversas moléculas que atuam localmente; (2) O acúmulo de lipídios também pode ocorrer em células que normalmente não armazenam gordura, resultando em disfunção ou mesmo na morte dessas células, um fenômeno conhecido como lipotoxicidade. Essas adaptações celulares anormais podem ter efeitos adversos sobre o músculo cardíaco, que é um dos vários mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de cardiomiopatia em indivíduos obesos.

O nebivolol, um β -bloqueador com propriedades vasodilatadoras singulares em comparação com outros agentes dessa classe, desempenhou um papel relevante na restauração da função cardíaca durante a obesidade¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Este medicamento atua inibindo os receptores β_1 -adrenérgicos no coração, atenuando assim a resposta às catecolaminas endógenas, como a adrenalina, que normalmente aumentam a frequência cardíaca e a contratilidade miocárdica¹⁰⁹. Em indivíduos obesos, frequentemente observa-se hiperatividade simpática, levando ao aumento da atividade cardíaca e da pressão arterial^{110,111}. Nesse caso, o nebivolol pode normalizar essas respostas, aliviando a sobrecarga no coração e melhorando sua eficiência.

Além disso, o nebivolol demonstra propriedades vasodilatadoras ao induzir a produção de óxido nítrico nas células endoteliais vasculares ¹¹². Isso resulta na dilatação dos vasos sanguíneos, reduzindo a resistência vascular periférica e otimizando o débito cardíaco. Adicionalmente, o nebivolol pode contribuir para a redução da pressão arterial por reduzir a carga de trabalho cardíaca ¹¹³. Ao reduzir a frequência cardíaca, a contratilidade miocárdica e a pré-carga ventricular, o fármaco promove uma função cardíaca mais eficaz.

Além dos impactos sobre a função cardiovascular, a obesidade é um estado fisiológico complexo que também tem impacto no perfil lipídico do organismo. A relação entre obesidade e dislipidemia, ou seja, níveis anormais de lipídios no sangue, é bem estabelecida ^{100-102,114,115}. A obesidade exerce um impacto significativo e multifacetado no perfil lipídico do organismo. Ela frequentemente resulta em um aumento dos níveis de triglicerídeos, uma diminuição do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), e pode ocasionalmente aumentar o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) ¹¹⁶. Além disso, a obesidade pode levar à formação de partículas menores e mais densas de LDL, que são mais aterogênicas. Isso ocorre frequentemente em conjunto com a resistência à insulina, contribuindo para o aumento da produção hepática de triglicerídeos.

Em consonância a estudos prévios, nossos resultados mostraram que animais submetidos a uma dieta hipercalórica desenvolveram dislipidemia, com aumento nos níveis de colesterol LDL, triglicerídeos e colesterol total, e redução do HDL. Surpreendentemente, o tratamento com nebivolol reverteu essas alterações, exceto para o HDL. Um dos principais mecanismos subjacentes a esses efeitos parece residir na ativação da eNOS, que culmina na amplificação da síntese de NO. Esse incremento na produção de NO, um conhecido vasodilatador endógeno, precipita uma cascata de eventos fisiológicos. Notavelmente, essa vasodilatação resulta na restauração da homeostase endotelial e na otimização da complacência vascular. Isso adquire relevância direta quando se considera o perfil lipídico, uma vez que uma rede vascular robusta facilita o trânsito sanguíneo, diminuindo a propensão à formação de lesões ateroscleróticas. Em última análise, um leito vascular saudável agiliza o transporte e o metabolismo dos lipídios, contribuindo, por conseguinte, para a regulação homeostática dos níveis de colesterol circulante.

Além disso, nota-se que o nebivolol exerce impacto nos níveis de norepinefrina, o que incide na modulação da lipólise em adipócitos. Essa regulação resulta numa redução da disponibilidade de ácidos graxos para captação hepática, mitigando, assim, a síntese hepática de triglicerídeos. Esses mecanismos, quando entrelaçados, estabelecem uma abordagem multifacetada para combater a dislipidemia que rotineiramente coexiste com a obesidade, com perspectivas significativas na mitigação dos riscos cardiovasculares nesse contingente populacional. Isso ressalta o efeito benéfico do nebivolol na normalização dos níveis de lipídios, um efeito não visto com outros fármacos β -bloqueadores, como o metoprolol ⁸⁰.

A obesidade visceral pode impactar adversamente o fluxo sanguíneo e a função renal por meio de múltiplos mecanismos ¹¹⁷. O aumento do fluxo sanguíneo renal, resultado das demandas impostas pelo tecido adiposo em expansão, pode aumentar o risco de lesões glomerulares e, portanto, o risco de doença renal. Além disso, o tecido adiposo é uma fonte de hormônios que afetam negativamente o SRAA, desencadeando inflamação, vasoconstrição e retenção de sódio, todos contribuindo para a disfunção renal ¹¹⁸. A compressão dos vasos sanguíneos renais devido ao excesso de gordura ao redor dos rins pode ainda agravar a situação, comprometendo o suprimento sanguíneo renal e a função do órgão ¹¹⁷. Neste trabalho, evidenciamos que uma dieta hipercalórica elevou os níveis de sódio, potássio e creatinina no sangue, indicando disfunção renal, correspondendo a achados em pacientes obesos ^{119,120}. Intrigantemente, a administração de nebivolol reverteu esses efeitos, sugerindo um papel renoprotetor deste fármaco. Esses resultados reforçam a conexão entre a obesidade e a comprometida função renal, enquanto destacam o potencial benéfico do nebivolol como um agente protetor dos rins. Investigação anterior já havia insinuado que o nebivolol pode atenuar a nefrotoxicidade da cisplatina, em um processo mediado pela produção de NO ¹²¹.

Já se tem estabelecida a disfunção vascular associada à obesidade, podendo se pronunciar tanto via favorecimento de mecanismos de síntese e secreção de fatores contráteis, quanto pelo prejuízo sobre vias de relaxamento. Semelhante ao encontrado em trabalhos prévios ^{122,123}, nossos resultados evidenciam a perda do efeito anti-contrátil do PVAT, resposta essa que foi revertida pelo tratamento farmacológico com nebivolol. Por outro lado, artérias que tiveram seu PVAT removido, não apresentaram alteração na resposta contrátil à fenilefrina. Como consequência da perda do efeito anti-contrátil do

PVAT ocorreu hipercontratibilidade vascular que foi evidenciada pelo aumento da resposta à fenilefrina e KCl.

A ativação dos receptores β_3 pelo nebivolol abre uma perspectiva promissora para a restauração da função do PVAT em condições de obesidade. O PVAT desempenha um papel central na regulação vascular, secretando uma gama de substâncias sinalizadoras, incluindo adipocinas, que exercem influência sobre a função vascular. O nebivolol, ao ativar os receptores β_3 , tem o potencial de estimular a liberação de adiponectina, uma adipocina com propriedades anti-inflamatórias que pode aprimorar a função do PVAT. Como resultado, a inflamação vascular associada à obesidade é mitigada, e o PVAT recupera sua habilidade de regular o tônus vascular.

Entre os fatores que contribuem para a alteração do efeito anti-contrátil do PVAT durante a obesidade, destacam-se a inflamação, mudanças no perfil de secreção de adipocinas e estresse oxidativo ¹²⁴. Essas mudanças, quando combinadas, perturbam o equilíbrio funcional do PVAT, resultando em disfunção vascular. A perda do fenótipo anti-contrátil do PVAT pode ser atribuída à diminuição na produção de fatores relaxantes ou ao favorecimento de fatores envolvidos em vias contráteis.

Nossas observações destacam que, durante a obesidade, ocorre um aumento significativo na produção de $O_2^{\cdot-}$, atribuído em grande parte à atividade da enzima NADPH oxidase no PVAT e no LAM. Notavelmente, o tratamento farmacológico com nebivolol foi capaz de reverter essa resposta, indicando seu potencial em modular os processos redox na vasculatura obesa. A incubação de artérias mesentéricas na presença do sequestrador de $O_2^{\cdot-}$, tiron, resultou na reversão do aumento na resposta contrátil das artérias mesentéricas de animais obesos quando o PVAT estava presente. Isso respalda a hipótese de que o aumento na síntese de ERO desempenha um papel crucial na disfunção vascular mediada pelo PVAT durante a obesidade, e que o tratamento com nebivolol pode interferir nesse processo regulando a atividade da NADPH oxidase.

No contexto vascular, a principal fonte de $O_2^{\cdot-}$ é o complexo enzimático NADPH oxidase, composto por várias subunidades, como Nox1, Nox2 e Nox4 ¹²⁵. Durante a obesidade, há um aumento na expressão dessas subunidades, levando a uma produção excessiva de $O_2^{\cdot-}$ ^{126,127}. Isso sugere que o excesso de $O_2^{\cdot-}$ gerado pelo PVAT na obesidade pode impactar negativamente o tônus vascular, influenciando vias de sinalização redox.

No entanto, a administração de nebivolol demonstrou eficácia na redução da produção de $O_2^{\cdot-}$, indicando que o fármaco pode regular a atividade da NADPH oxidase, possivelmente contribuindo para a restauração da função anti-contrátil do PVAT.

O aumento na produção de $O_2^{\cdot-}$ desencadeia uma série de respostas em nível local e sistêmico, envolvendo vias de oxidação e redução, alterações no DNA, remodelamento vascular e peroxidação lipídica ^{128,129}. Neste estudo, observamos que o estresse oxidativo associado à obesidade resultou em um aumento nas concentrações plasmáticas e teciduais de MDA, um marcador de peroxidação lipídica. No entanto, o tratamento com nebivolol conseguiu reverter essa resposta, sugerindo um potencial papel do fármaco na modulação da NADPH oxidase e na atenuação da peroxidação lipídica. Portanto, essas descobertas destacam o potencial do nebivolol em modular a função vascular em um contexto de obesidade, por meio da regulação das respostas redox e da atividade da NADPH oxidase.

Para combater os efeitos deletérios associados ao aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$, o organismo humano depende das enzimas SOD, que catalisam a conversão do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , mitigando os danos oxidativos. No entanto, em condições de obesidade, a eficácia das SOD pode ser comprometida. O aumento do tecido adiposo associado à obesidade resulta em uma maior geração de ERO sobrecarregando os sistemas antioxidantes, incluindo a SOD ¹³⁰. Além disso, a inflamação crônica característica da obesidade pode afetar tanto a expressão quanto a atividade das SOD, reduzindo sua capacidade de neutralizar as ERO.

Observou-se que o aumento de ERO no PVAT está relacionado a uma diminuição na expressão da enzima Cu/Zn-SOD, também conhecida como SOD1, que utiliza cobre e zinco como cofatores e é encontrada tanto no citoplasma quanto na região intermembranar da mitocôndria ⁵⁴. No entanto, nossas observações revelaram que, embora não tenha havido alteração na atividade da SOD no PVAT mesentérico após a indução da obesidade ou o tratamento com nebivolol, no LAM, a obesidade promoveu uma redução na atividade da SOD, resposta essa que foi revertida pelo tratamento com o nebivolol. Portanto, nossos resultados sugerem uma influência negativa da obesidade sobre a atividade da SOD na região do LAM. Curiosamente, o nebivolol demonstrou a capacidade de aumentar a atividade da SOD no LAM de animais mantidos sob dieta padrão.

Com base nessas constatações, é plausível inferir que o nebivolol, além de controlar o estresse oxidativo por meio da redução da produção de ERO, também modula de forma positiva os componentes do sistema de defesa antioxidante, reforçando seu potencial como agente terapêutico na obesidade e suas complicações metabólicas.

A ação da SOD desempenha um papel fundamental na formação de H_2O_2 , uma ERO com impacto importante no controle do tônus vascular ³⁶. O H_2O_2 age como um sinalizador vascular e tem a capacidade de promover a vasodilatação em artérias mesentéricas, devido à sua ação na abertura de canais de K^+ ¹³¹. A abertura desses canais resulta na saída de K^+ das células, hiperpolarizando a membrana celular e relaxando o músculo liso, levando, assim, à vasodilatação.

Surpreendentemente, em um contexto de obesidade, apesar da maior atividade da SOD, observou-se uma diminuição nos níveis de H_2O_2 no PVAT mesentérico. Isso pode ser explicado por um mecanismo adaptativo, onde o organismo aumenta a defesa antioxidante, possivelmente por meio de peroxidases como a catalase e a glutathione peroxidase, que convertem o H_2O_2 em água e oxigênio ⁵¹. Esse processo pode explicar a redução dos níveis de H_2O_2 . Curiosamente, não se observou uma alteração significativa nos níveis de H_2O_2 no LAM, sugerindo que, apesar da redução na atividade da SOD durante a obesidade, ainda há um substrato em excesso para que essa enzima converta o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 .

No contexto da obesidade, as alterações metabólicas e inflamatórias podem ter um impacto negativo no funcionamento da catalase, uma enzima antioxidante ¹³². Os resultados demonstram que, na obesidade, a atividade da catalase foi reduzida no LAM, enquanto no PVAT mesentérico não houve alteração significativa. Diversos fatores podem contribuir para essa redução, incluindo a sobrecarga na produção de espécies oxidantes, a oxidação de enzimas antioxidantes e a diminuição da expressão dessas enzimas nos tecidos avaliados ^{93,126}. De maneira intrigante, o tratamento com nebivolol não apenas aumentou a atividade da catalase no PVAT mesentérico de animais com dieta padrão, como também restaurou a atividade no LAM em animais obesos. Essas respostas podem ser atribuídas a mecanismos que regulam a expressão gênica ou a estabilidade da enzima, sugerindo que o nebivolol possui um impacto benéfico na modulação do estresse oxidativo e na função vascular, especialmente em condições de obesidade.

O NO desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular mesentérico, orquestrando a dilatação dos vasos sanguíneos e influenciando diretamente o fluxo sanguíneo dentro do sistema gastrointestinal^{133,134}. Essa regulação vascular é vital para garantir a perfusão adequada dos tecidos gastrointestinais e manter um controle preciso da pressão arterial local^{135,136}. No entanto, durante a obesidade, vários fatores prejudicam o sistema de sinalização do NO¹³⁷.

A resistência à insulina e a disfunção endotelial, frequentemente associadas à obesidade, comprometem a produção e disponibilidade do NO, inclinando o equilíbrio para uma maior constrição vascular devido a alterações na sinalização^{137,138}. Além disso, a obesidade promove a geração aumentada de ERO, como o $O_2^{\cdot-}$, que pode interagir com o NO, resultando na formação do peroxinitrito (ONOO⁻). Essa espécie reativa tem um potencial considerável para inativar o NO, prejudicando sua função vasodilatadora. No entanto, é importante destacar que, em meio a esse cenário desafiador, o efeito agonista do nebivolol nos receptores β_3 pode se destacar como um mecanismo capaz de contrabalançar essas perturbações. A ativação desses receptores pode promover a liberação de NO a partir dos adipócitos do PVAT que envolve os vasos mesentéricos, estimulando a vasodilatação e, assim, contribuindo para a restauração do equilíbrio no controle do tônus vascular em condições de obesidade.

Em nossa investigação focada na disfunção do PVAT relacionada à obesidade, exploramos minuciosamente o papel do NO nesse contexto. Observamos que o NO desempenha um papel fundamental na manutenção do efeito anti-contrátil do PVAT em condições normais, uma vez que a inibição do NO com L-NAME resultou em um aumento substancial na resposta contrátil das artérias de animais do grupo controle. Surpreendentemente, no grupo de animais obesos, a inibição do NO teve um impacto consideravelmente menor na potência e na resposta máxima, em comparação com os animais de controle. Esses achados sugerem fortemente a participação da via nitrérgica na disfunção do PVAT associada à obesidade, onde a ineficácia do NO pode ser um dos principais contribuintes para o desequilíbrio no controle do tônus vascular mesentérico. Ao introduzir o tratamento farmacológico com nebivolol, observamos a restauração do padrão de resposta contrátil, que se assemelha ao grupo controle. Isso ressalta a capacidade do nebivolol em combater a disfunção do PVAT relacionada à obesidade, um

efeito que pode ser atribuído à sua ativação dos receptores β_3 , que pode, por sua vez, estimular a liberação de NO, restabelecendo a homeostase do tônus vascular.

Nesse sentido, a avaliação dos níveis de NO_2^- é uma abordagem essencial para inferir indiretamente sobre os níveis de NO no organismo. Dado que o NO é altamente reativo e de vida curta, sua medição direta tem diversas limitações. Portanto, a quantificação do nitrito, um produto mais estável da degradação do NO, fornece informações sobre os níveis do NO em várias condições fisiológicas e patológicas. Nossos resultados de dosagem de NO_2^- reforçam a ideia de que a obesidade impacta a via nitrérgica mesentérica. Notamos redução nos níveis de nitrito no PVAT de animais obesos, assim como nos níveis circulantes.

Na obesidade, o tecido adiposo, incluindo o PVAT, desempenha um papel crucial no estado inflamatório de baixo grau. Os neutrófilos, células de defesa, não apenas combatem patógenos, mas também estão envolvidos na inflamação e podem agravar distúrbios metabólicos, como a inflamação associada à obesidade ¹³⁹.

Durante a obesidade, ocorre a liberação aumentada de citocinas inflamatórias do tecido adiposo, como TNF- α e IL-6, atraindo e ativando neutrófilos que migram para o PVAT. Uma vez no tecido adiposo, os neutrófilos liberam substâncias prejudiciais, como enzimas e ERO, $\text{O}_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , que causam danos locais, contribuindo para inflamação ¹⁴⁰. A interação entre essas substâncias inflamatórias e células imunes desencadeia um ciclo contínuo de inflamação no PVAT, resultando em disfunção endotelial, remodelamento vascular e alterações no tônus vascular associadas à obesidade ²³.

Nossos resultados destacam que na obesidade ocorre um aumento significativo do recrutamento de neutrófilos para o PVAT e LAM, indicando uma resposta inflamatória local mais intensa. Esse aumento pode ser atribuído a várias mudanças morfológicas, incluindo hipóxia devido à hipertrofia dos adipócitos, maior atividade metabólica do tecido adiposo, aumento da produção de ERO e comprometimento da função antioxidante, entre outros fatores. Vale ressaltar que o aumento do recrutamento de neutrófilos é crucial para a resposta inflamatória, sendo essas células a primeira linha de defesa do organismo, promovendo o recrutamento de outros tipos celulares. ¹³⁹.

Após o tratamento com nebivolol, notamos uma reversão no recrutamento de neutrófilos induzido pela obesidade em ambos os tecidos estudados. Isso sugere que o

nebivolol interfere na sinalização dos fatores envolvidos na inflamação da obesidade como quimiocinas ^{141,142}. Em pacientes hipertensos, o nebivolol reduziu os níveis de neutrófilos, diminuindo a relação neutrófilos-linfócitos e revertendo biomarcadores de inflamação subclínica, ao contrário do metoprolol ¹⁴³. Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores que mostraram que o nebivolol pode melhorar parâmetros inflamatórios associados à hipertensão, destacando seus efeitos além da vasodilatação e ação antioxidante amplamente reconhecidos ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Além disso, a inflamação crônica da obesidade envolve a infiltração de macrófagos pró-inflamatórios nos tecidos adiposos, incluindo o PVAT ¹⁴⁷. Quando ativados, esses macrófagos liberam mediadores inflamatórios, como citocinas e ERO, contribuindo para danos oxidativos e inflamação local ¹⁴⁸. Sua interação com outras células, como adipócitos e células endoteliais, intensifica ainda mais a inflamação. A polarização dos macrófagos em fenótipos M1 ou M2 também influencia sua atividade inflamatória, dependendo do estímulo recebido ^{149,150}.

Nossos resultados destacam que a obesidade aumenta o recrutamento de macrófagos para o PVAT e LAM, indicado pela atividade da mieloperoxidase, possivelmente devido ao aumento de neutrófilos. O tratamento com nebivolol reduz a infiltração de macrófagos tanto no PVAT quanto no LAM. Além disso, a citometria de fluxo confirma o aumento da infiltração de macrófagos pró-inflamatórios no PVAT durante a obesidade. O tratamento com nebivolol em animais obesos reduziu a população total de macrófagos e a frequência daqueles que expressam TNF- α , sugerindo a capacidade do nebivolol de reverter a inflamação associada à obesidade no PVAT.

Assim, além de melhorar o perfil lipídico, homeostase redox e atividade nitrérgica, o nebivolol também tem efeitos anti-inflamatórios no PVAT. Em conjunto, esses efeitos contribuem para o reestabelecimento do tônus vascular mesentérico.

Além disso, investigamos o perfil de macrófagos no LAM para obter uma visão mais abrangente. Contrariamente aos resultados da atividade da NAG, nossas descobertas sugerem que o LAM pode responder de maneira distinta ao estímulo da obesidade em comparação com o PVAT. No entanto, o tratamento com nebivolol reduziu o número de macrófagos CD45⁺CD11b⁺CD68⁺ no LAM, embora não tenha afetado a frequência

daqueles que expressam TNF- α nesse tecido. Isso indica que a ação anti-inflamatória do nebivolol pode variar entre os tecidos.

Em síntese, os resultados deste estudo oferecem uma visão abrangente das complexas interações entre a obesidade, a disfunção vascular e os mecanismos inflamatórios, com foco no PVAT mesentérico. O PVAT emerge como um elemento central na regulação do tônus vascular e da resposta inflamatória local. A disfunção vascular associada à obesidade é multifacetada, envolvendo desde alterações na sinalização do NO até a ativação de vias oxidativas e inflamatórias.

A disfunção do efeito anti-contrátil do PVAT é um marco chave nesse cenário, resultando em disfunção no equilíbrio vasomotor e comprometendo o fluxo sanguíneo adequado. O nebivolol, além de seu papel tradicional como β -bloqueador, demonstra ações pleiotrópicas notáveis, abordando aspectos oxidativos e inflamatórios. A capacidade do nebivolol em reduzir a produção de ERO e restaurar a atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD e a catalase, é crucial para conter o estresse oxidativo exacerbado observado na obesidade.

A influência do nebivolol na modulação dos componentes inflamatórios, como neutrófilos e macrófagos, também é evidente. Sua capacidade de reduzir o recrutamento de neutrófilos e a infiltração de macrófagos no PVAT e no LAM sugere um impacto benéfico na resposta inflamatória desencadeada pela obesidade. O fármaco não apenas restaura a função anti-contrátil do PVAT, mas também parece mitigar os mecanismos pró-inflamatórios, desempenhando um papel crucial na preservação do equilíbrio vascular e na atenuação das complicações cardiovasculares associadas à obesidade.

Portanto, este estudo lança luz sobre as múltiplas vias pelas quais a obesidade afeta o sistema vascular, destaca a importância do PVAT como um componente crucial nesse cenário e ressalta as propriedades terapêuticas potenciais do nebivolol para modular a disfunção vascular e a inflamação associadas à obesidade. As descobertas apresentadas expandem nosso conhecimento sobre as complexas interações entre obesidade, disfunção vascular e inflamação, abrindo novas perspectivas para abordagens terapêuticas inovadoras visando a preservação da saúde cardiovascular em indivíduos obesos.

7. Conclusão

Concluimos que o nebivolol reverteu a perda do efeito anti-contrátil do PVAT por promover ações antioxidantes que incluem redução da produção de $O_2^{\cdot-}$, aumento da atividade antioxidante, restauro da atividade nitrérgica e redução de parâmetros inflamatórios. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o PVAT pode constituir um importante alvo para o tratamento da disfunção vascular induzida pela obesidade e que o nebivolol surge como uma ferramenta potencial no manejo da hipertensão secundária e complicações vasculares induzidas pela obesidade. Os resultados podem guiar novas abordagens terapêuticas e o uso clínico mais eficiente do nebivolol em pacientes obesos hipertensos, reduzindo o risco cardiovascular.

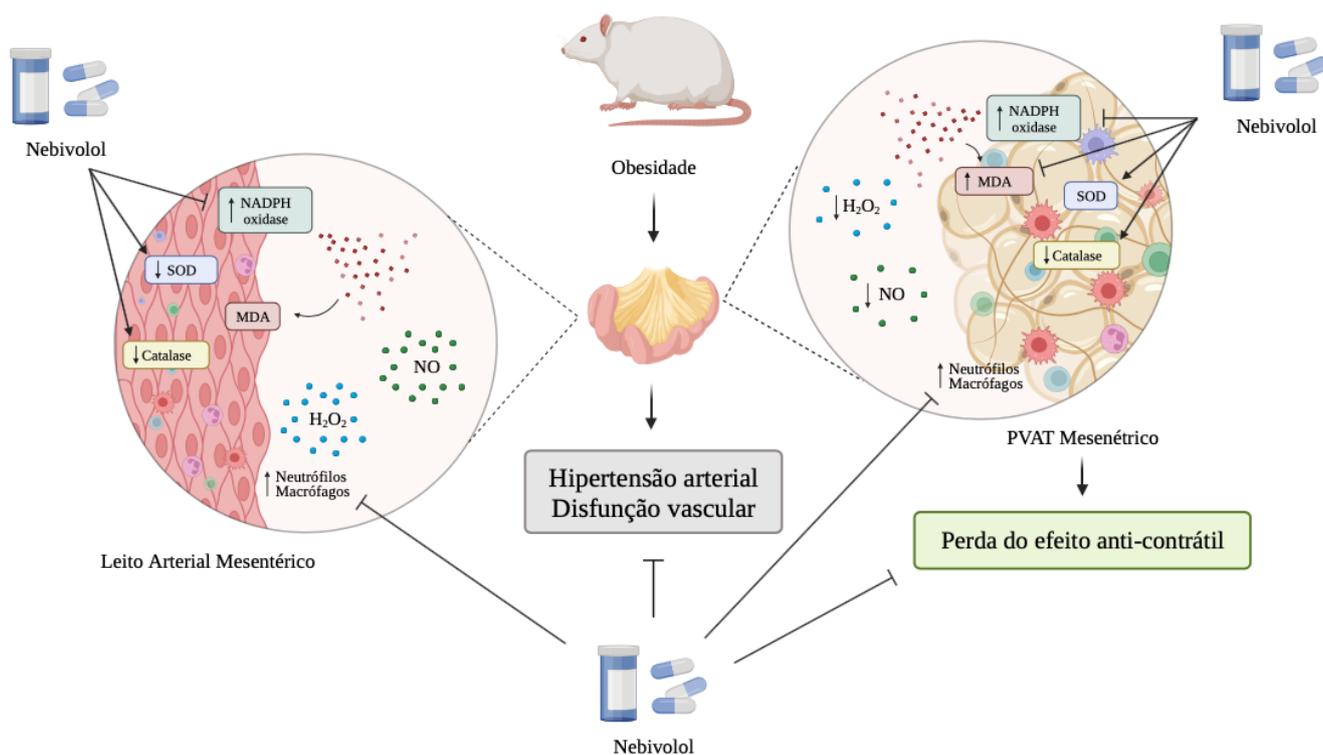


Figura 26. Proposta de mecanismo do efeito protetor do nebivolol em relação aos efeitos vasculares deletérios associados à obesidade. O nebivolol reduz a produção excessiva de ERO e recrutamento de fatores inflamatórios, além de restaurar a capacidade antioxidante no PVAT e LAM. H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, MDA: Malondialdeído, NO: óxido nítrico.

8. Referências bibliográficas

1. Loos, R. J. F. Genetic determinants of common obesity and their value in prediction. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 211–226 (2012).
2. Gebreab, S. Z. *et al.* Psychosocial Stress Over the Lifespan, Psychological Factors, and Cardiometabolic Risk in the Community. *Psychosom. Med.* **80**, 628–639 (2018).
3. Sommer, I. *et al.* Socioeconomic inequalities in non-communicable diseases and their risk factors: an overview of systematic reviews. *BMC Public Health* **15**, 914 (2015).
4. SALLIS, J. F. & GLANZ, K. Physical Activity and Food Environments: Solutions to the Obesity Epidemic. *Milbank Q.* **87**, 123–154 (2009).
5. Franks, P. W. & McCarthy, M. I. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity. *Science (80-.)*. **354**, 69–73 (2016).
6. Okorodudu, D. O. *et al.* Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Obes.* **34**, 791–799 (2010).
7. Romero-Corral, A. *et al.* Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. *Int. J. Obes.* **32**, 959–966 (2008).
8. Pack, Q. R. *et al.* Diagnostic Performance of Weight Loss to Predict Body Fatness Improvement in Cardiac Rehabilitation Patients. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* **33**, 68–76 (2013).
9. Rao, G. *et al.* Identification of Obesity and Cardiovascular Risk in Ethnically and Racially Diverse Populations. *Circulation* **132**, 457–472 (2015).
10. Heymsfield, S. B., Peterson, C. M., Thomas, D. M., Heo, M. & Schuna, J. M. Why are there race/ethnic differences in adult body mass index-adiposity relationships? A quantitative critical review. *Obes. Rev.* **17**, 262–275 (2016).
11. Global Burden of Disease (GBD) 2015 Obesity Collaborators. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N. Engl. J. Med.* **377**, 13–27 (2017).
12. Maffetone, P. B., Rivera-Dominguez, I. & Laursen, P. B. Overfat and Underfat: New Terms and Definitions Long Overdue. *Front. Public Heal.* **4**, (2017).
13. Di Angelantonio, E. *et al.* Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet* **388**, 776–786 (2016).
14. Aprahamian, T. R. & Sam, F. Adiponectin in cardiovascular inflammation and obesity. *Int. J. Inflamm.* **2011**, 1–8 (2011).
15. Unamuno, X. *et al.* Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in

- human obesity. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, (2018).
16. Mathew, B., Francis, L., Kayalar, A. & Cone, J. Obesity: effects on cardiovascular disease and its diagnosis. *J. Am. Board Fam. Med.* **21**, 562–568 (2008).
 17. Mraz, M. & Haluzik, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J. Endocrinol.* **222**, 113–127 (2014).
 18. Rodríguez-Hernández, H., Simental-Mendía, L. E., Rodríguez-Ramírez, G. & Reyes-Romero, M. A. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, (2013).
 19. Balsan, G. A., Da Costa Vieira, J. L., De Oliveira, A. M. & Portal, V. L. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **61**, 72–80 (2015).
 20. Keane, K. N., Cruzat, V. F., Carlessi, R., De Bittencourt, P. I. H. & Newsholme, P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, (2015).
 21. Ridker, P. M. *et al.* Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur. Heart J.* **39**, 3499–3507 (2018).
 22. Kaptoge, S. *et al.* C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: An individual participant meta-analysis. *Lancet* **375**, 132–140 (2010).
 23. De Carvalho, M. H., Colaço, A. L. & Fortes, Z. B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **50**, 304–312 (2006).
 24. Gomes, F. *et al.* Obesity and coronary artery disease: role of vascular inflammation. *Arq. Bras. Cardiol.* **94**, 273–279 (2010).
 25. Cai, H. & Harrison, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ. Res.* **87**, 840–844 (2000).
 26. Sun, H. J., Wu, Z. Y., Nie, X. W. & Bian, J. S. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The link between inflammation and hydrogen sulfide. *Front. Pharmacol.* **10**, 493254 (2020).
 27. Widmer, R. J. & Lerman, A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2014**, 291 (2014).
 28. Maeda, N., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Shimomura, I. Adiponectin, a unique adipocyte-derived factor beyond hormones. *Atherosclerosis* **292**, 1–9 (2020).
 29. Sena, C. M., Pereira, A., Fernandes, R., Letra, L. & Seça, R. M. Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: role of perivascular adipose tissue. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 3514–3526 (2017).

30. Deng, G., Long, Y., Yu, Y. R. & Li, M. R. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int. J. Obes. (Lond)*. **34**, 165–171 (2010).
31. Zalesin, K. C., Franklin, B. A., Miller, W. M., Peterson, E. D. & McCullough, P. A. Impact of obesity on cardiovascular disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **37**, 663–684 (2008).
32. Bastien, M., Poirier, P., Lemieux, I. & Després, J. P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity to Cardiovascular Disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **56**, 369–381 (2014).
33. Boydens, C., Maenhaut, N., Pauwels, B., Decaluwé, K. & Van De Voorde, J. Adipose Tissue as Regulator of Vascular Tone. *Curr. Hypertens. Reports 2012 143* **14**, 270–278 (2012).
34. Frankl, J., Sherwood, A., Clegg, D. J., Scherer, P. E. & Öz, O. K. Imaging Metabolically Active Fat: A Literature Review and Mechanistic Insights. *Int. J. Mol. Sci. 2019, Vol. 20, Page 5509* **20**, 5509 (2019).
35. Szasz, T. & Webb, R. C. Perivascular adipose tissue: More than just structural support. *Clin. Sci.* **122**, 1–12 (2012).
36. Cheng, C. K., Bakar, H. A., Gollasch, M. & Huang, Y. Perivascular Adipose Tissue: the Sixth Man of the Cardiovascular System. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **32**, 481 (2018).
37. Li, X., Ma, Z. & Zhu, Y. Z. Regional Heterogeneity of Perivascular Adipose Tissue: Morphology, Origin, and Secretome. *Front. Pharmacol.* **12**, (2021).
38. Tran, K.-V., Fitzgibbons, T., Min, S. Y., DeSouza, T. & Corvera, S. Distinct adipocyte progenitor cells are associated with regional phenotypes of perivascular aortic fat in mice. *Mol. Metab.* **9**, 199–206 (2018).
39. Padilla, J., Jenkins, N. T., Vieira-Potter, V. J. & Laughlin, M. H. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **304**, R543–R552 (2013).
40. Police, S. B., Thatcher, S. E., Charnigo, R., Daugherty, A. & Cassis, L. A. Obesity Promotes Inflammation in Periaortic Adipose Tissue and Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 1458–1464 (2009).
41. Fitzgibbons, T. P. *et al.* Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **301**, H1425–H1437 (2011).
42. Brown, N. K. *et al.* Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: A review of current research and animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1621–1630 (2014).
43. Waldén, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B. & Nedergaard, J.

- Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *Am. J. Physiol. Metab.* **302**, E19–E31 (2012).
44. Soltis, E. E. & Cassis, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin. Exp. Hypertens.* **A13**, 277–296 (1991).
 45. Rami, A. Z. A., Hamid, A. A., Anuar, N. N. M., Aminuddin, A. & Ugusman, A. Exploring the Relationship of Perivascular Adipose Tissue Inflammation and the Development of Vascular Pathologies. *Mediators Inflamm.* (2022).
 46. GAO, Y. *et al.* Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc. Res.* **71**, 363–373 (2006).
 47. Griendling, K. K. *et al.* Oxidative Stress and Hypertension. *Circ. Res.* **128**, 993–1020 (2021).
 48. Bedard, K. & Krause, K.-H. H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **87**, 245–313 (2007).
 49. Brandes, R. P., Weissmann, N. & Schröder, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic. Biol. Med.* **76**, 208–226 (2014).
 50. Bouraoui, A. *et al.* New insights in the molecular regulation of the NADPH oxidase 2 activity: Negative modulation by Poldip2. *Free Radic. Biol. Med.* **199**, 113–125 (2023).
 51. Rebolledo, A. *et al.* Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue. *Cardiovasc. Diabetol.* **9**, 1–9 (2010).
 52. van der Vliet, A. Antioxidant Defenses in the Lung. *Comp. Biol. Norm. Lung Second Ed.* 489–507 (2015) doi:10.1016/B978-0-12-404577-4.00025-4.
 53. Gaté, L., Paul, J., Ba, G. N., Tew, K. D. & Tapiero, H. Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomed. Pharmacother.* **53**, 169–180 (1999).
 54. Gil-Ortega, M. *et al.* Imbalance between Pro and Anti-Oxidant Mechanisms in Perivascular Adipose Tissue Aggravates Long-Term High-Fat Diet-Derived Endothelial Dysfunction. *PLoS One* **9**, e95312 (2014).
 55. Costa, R. M. *et al.* H₂O₂ generated from mitochondrial electron transport chain in thoracic perivascular adipose tissue is crucial for modulation of vascular smooth muscle contraction. *Vascul. Pharmacol.* **84**, 28–37 (2016).
 56. Owen, M. K. *et al.* Perivascular adipose tissue potentiates contraction of coronary vascular smooth muscle: Influence of obesity. *Circulation* **128**, 9–18 (2013).
 57. Narkiewicz, K. Obesity and hypertension--the issue is more complex than we thought. *Nephrol. Dial. Transplant* **21**, 264–267 (2006).
 58. Reisin, E. & Jack, A. V. Obesity and hypertension: mechanisms, cardio-renal consequences, and therapeutic approaches. *Med. Clin. North Am.* **93**, 733–751

- (2009).
59. Kotsis, V., Stabouli, S., Papakatsika, S., Rizos, Z. & Parati, G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens. Res.* **33**, 386–393 (2010).
 60. Kotchen, T. A. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, and clinical management. *Am. J. Hypertens.* **23**, 1170–1178 (2010).
 61. Hall, J. E., Do Carmo, J. M., Da Silva, A. A., Wang, Z. & Hall, M. E. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ. Res.* **116**, 991–1006 (2015).
 62. Wirix, A. J. G., Kaspers, P. J., Nauta, J., Chinapaw, M. J. M. & Kist-van Holthe, J. E. Pathophysiology of hypertension in obese children: a systematic review. *Obes. Rev.* **16**, 831–842 (2015).
 63. Lambert, E. A., Straznicki, N. E., Dixon, J. B. & Lambert, G. W. Should the sympathetic nervous system be a target to improve cardiometabolic risk in obesity? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **309**, H244–H258 (2015).
 64. Stepniakowski, K. T., Goodfriend, T. L. & Egan, B. M. Fatty Acids Enhance Vascular α -Adrenergic Sensitivity. *Hypertension* **25**, 774–778 (1995).
 65. Alvarez, G. E., Beske, S. D., Ballard, T. P. & Davy, K. P. Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation* **106**, 2533–2536 (2002).
 66. Thorp, A. A. & Schlaich, M. P. Relevance of Sympathetic Nervous System Activation in Obesity and Metabolic Syndrome. *J. Diabetes Res.* **2015**, (2015).
 67. Naguib, M. T. Kidney disease in the obese patient. *South. Med. J.* **107**, 481–485 (2014).
 68. Hall, J. E., Guyton, A. C., Coleman, T. G., Mizelle, H. L. & Woods, L. L. Regulation of arterial pressure: role of pressure natriuresis and diuresis. *Fed. Proc.* **45**, 2897–903 (1986).
 69. Goodfriend, T. L. Obesity, sleep apnea, aldosterone, and hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **10**, 222–226 (2008).
 70. Sarzani, R., Salvi, F., Dessì-Fulgheri, P. & Rappelli, A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J. Hypertens.* **26**, 831–843 (2008).
 71. Bomback, A. S. & Klemmer, P. J. Interaction of aldosterone and extracellular volume in the pathogenesis of obesity-associated kidney disease: a narrative review. *Am. J. Nephrol.* **30**, 140–146 (2009).
 72. Frigolet, M. E., Torres, N. & Tovar, A. R. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 2003–2015 (2013).
 73. Barroso, W. K. S. *et al.* Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. *Arq.*

- Bras. Cardiol.* **116**, (2021).
74. Hirsch, J. S. & Hong, S. The Demystification of Secondary Hypertension: Diagnostic Strategies and Treatment Algorithms. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **21**, 1–27 (2019).
 75. Grundy, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* **112**, 2735–2752 (2005).
 76. do Vale, G. T., Ceron, C. S., Gonzaga, N. A., Simplicio, J. A. & Padovan, J. C. Three Generations of β -blockers: History, Class Differences and Clinical Applicability. *Curr. Hypertens. Rev.* **15**, 22–31 (2019).
 77. Fonseca, V. A. Effects of β -blockers on glucose and lipid metabolism. *Curr. Med. Res. Opin.* **26**, 615–629 (2010).
 78. Hirst, J. A., Farmer, A. J., Feakins, B. G., Aronson, J. K. & Stevens, R. J. Quantifying the effects of diuretics and β -adrenoceptor blockers on glycaemic control in diabetes mellitus – a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **79**, 733 (2015).
 79. Marketou, M., Gupta, Y., Jain, S. & Vardas, P. Differential Metabolic Effects of Beta-Blockers: an Updated Systematic Review of Nebivolol. **19**, 1–10 (2017).
 80. Ayers, K., Byrne, L. M., DeMatteo, A. & Brown, N. J. Differential Effects of Nebivolol and Metoprolol on Insulin Sensitivity and Plasminogen Activator Inhibitor in the Metabolic Syndrome. *Hypertension* **59**, 893–898 (2012).
 81. De Groot, A. A., Mathy, M. J., Van Zwieten, P. A. & Peters, S. L. M. Involvement of the beta3 adrenoceptor in nebivolol-induced vasorelaxation in the rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **42**, 232–236 (2003).
 82. Gao, J. *et al.* Nebivolol Improves Obesity-Induced Vascular Remodeling by Suppressing NLRP3 Activation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **73**, 326–333 (2019).
 83. do Vale, G. T. *et al.* Nebivolol prevents vascular oxidative stress and hypertension in rats chronically treated with ethanol. *Atherosclerosis* **274**, 67–76 (2018).
 84. Gupta, S. & Wright, H. M. Nebivolol: A highly selective β 1-adrenergic receptor blocker that causes vasodilation by increasing nitric oxide. *Cardiovasc. Ther.* **26**, 189–202 (2008).
 85. Wang, Y. *et al.* Nebivolol alleviates aortic remodeling through eNOS upregulation and inhibition of oxidative stress in L-NAME-induced hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **39**, 628–639 (2017).
 86. Ceron, C. S. *et al.* Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF- β and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 47–56 (2013).
 87. Saxton, S. N. *et al.* Restoring Perivascular Adipose Tissue Function in Obesity

- Using Exercise. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **35**, 1291 (2021).
88. Saxton, S. N. *et al.* Role of Sympathetic Nerves and Adipocyte Catecholamine Uptake in the Vasorelaxant Function of Perivascular Adipose Tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 880–891 (2018).
 89. Wolf, S. C. *et al.* Major differences in gene expression in human coronary smooth muscle cells after nebivolol or metoprolol treatment. *Int. J. Cardiol.* **125**, 4–10 (2008).
 90. Wolf, S. C. *et al.* Influence of Nebivolol and Metoprolol on Inflammatory Mediators in Human Coronary Endothelial or Smooth Muscle Cells. Effects on Neointima Formation After Balloon Denudation in Carotid Arteries of Rats Treated with Nebivolol. *Cell. Physiol. Biochem.* **19**, 129–136 (2007).
 91. Bortolin, R. C. *et al.* A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: Comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int. J. Obes.* **42**, 525–534 (2018).
 92. do Vale, G. T., Gonzaga, N. A., Simplicio, J. A. & Tirapelli, C. R. Nebivolol prevents ethanol-induced reactive oxygen species generation and lipoperoxidation in the rat kidney by regulating NADPH oxidase activation and expression. *Eur. J. Pharmacol.* **799**, 33–40 (2017).
 93. Gonzaga, N. A. *et al.* Melatonin reverses the loss of the anticontractile effect of perivascular adipose tissue in obese rats. *J. Pineal Res.* **70**, (2021).
 94. Xie, Q. *et al.* Nebivolol Ameliorates Cardiac NLRP3 Inflammasome Activation in a Juvenile-Adolescent Animal Model of Diet-Induced Obesity. *Sci. Rep.* **6**, 34326 (2016).
 95. Mulvany, M. J. & Aalkjaer, C. Physiological Reviews of Small Arteries. *Physiol. Rev.* **70**, 921–961 (1990).
 96. Yogi, A. *et al.* Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclo-oxygenase-dependent mechanisms. *Clin. Sci.* **118**, 657–668 (2010).
 97. Neidhold, S., Eichhorn, B., Kasper, M., Ravens, U. & Kaumann, A. J. The function of α - and β -adrenoceptors of the saphenous artery in caveolin-1 knockout and wild-type mice. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 261–270 (2007).
 98. Fonseca, C. S. M. *et al.* Distinct Influence of Hypercaloric Diets Predominant with Fat or Fat and Sucrose on Adipose Tissue and Liver Inflammation in Mice. *Molecules* **25**, 4369 (2020).
 99. Lee, Y. H. *et al.* Impact of Visceral Obesity on the Risk of Incident Metabolic Syndrome in Metabolically Healthy Normal Weight and Overweight Groups: A Longitudinal Cohort Study in Korea. *Korean J. Fam. Med.* **41**, 229 (2020).
 100. Kundel, V. *et al.* Measuring Visceral Adipose Tissue Metabolic Activity in Sleep Apnea Utilizing Hybrid ^{18}F -FDG PET/MRI: A Pilot Study. *Nat. Sci. Sleep* **Volume 13**, 1943–1953 (2021).

101. Pahk, K., Kwon, H. ., Eo, J. ., Seo, H. . & Kim, S. Metabolic activity of visceral fat and immune-related organs evaluated by 18F-FDG PET/CT is associated with the metabolic syndrome. *Eur. Heart J.* **41**, (2020).
102. Pahk, K., Kwon, Y., Kim, M. K., Park, S. & Kim, S. Visceral fat metabolic activity evaluated by 18F-FDG PET/CT is associated with osteoporosis in healthy postmenopausal Korean women. *Obes. Res. Clin. Pract.* **14**, 339–344 (2020).
103. Chrysant, S. G. Pathophysiology and treatment of obesity-related hypertension. *J. Clin. Hypertens.* **21**, 555 (2019).
104. Kasper, E. K., Hruban, R. H. & Baughman, K. L. Cardiomyopathy of obesity: A clinicopathologic evaluation of 43 obese patients with heart failure. *Am. J. Cardiol.* **70**, 921–924 (1992).
105. Alpert, M. A. Obesity cardiomyopathy: Pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **321**, 225–236 (2001).
106. Gammone, M. A., Efthymakis, K. & D’Orazio, N. Effect of Third-Generation Beta Blockers on Weight Loss in a Population of Overweight-Obese Subjects in a Controlled Dietary Regimen. *J. Nutr. Metab.* **2021**, (2021).
107. Pischon, T., Sharma, A. M., Mansmann, U. & Agrawal, R. Effect of forced titration of nebivolol on response rate in obese hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.* **16**, 98–100 (2003).
108. Manrique, C., Whaley-Connell, A. & Sowers, J. R. Nebivolol in Obese and Non-Obese Hypertensive Patients. *J. Clin. Hypertens.* **11**, 309 (2009).
109. Toblli, J., DiGennaro, F., Giani Jorge, F. & Fernando Pablo, D. Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility. *Vasc. Health Risk Manag.* **8**, 151 (2012).
110. Kalil, G. Z. & Haynes, W. G. Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications. *Hypertens. Res.* **2012** **35**, 4–16 (2011).
111. Esler, M. *et al.* Mechanisms of Sympathetic Activation in Obesity-Related Hypertension. *Hypertension* **48**, 787–796 (2006).
112. Pedersen, M. E. & Cockcroft, J. R. The vasodilatory beta-blockers. *Curr. Hypertens. Rep.* **9**, 269–277 (2007).
113. Veverka, A. & Salinas, J. L. Nebivolol in the treatment of chronic heart failure. *Vasc. Health Risk Manag.* **3**, 647 (2007).
114. Reis, V. M. C. P. *et al.* Interrelationships between obesity, blood pressure and metabolic profile in climacteric women. *Rev. Nutr.* **34**, (2021).
115. Jordan, J. *et al.* Joint statement of the European Association for the Study of Obesity and the European Society of Hypertension. *J. Hypertens.* **30**, 1047–1055 (2012).

116. Klop, B., Elte, J. W. F. & Cabezas, M. C. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients* **5**, 1218 (2013).
117. Miricescu, D. *et al.* Impact of adipose tissue in chronic kidney disease development (Review). *Exp. Ther. Med.* **21**, (2021).
118. Hall, J. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Wang, Z. & Hall, M. E. Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 367 (2019).
119. Dhondup, T. & Qian, Q. Acid-Base and Electrolyte Disorders in Patients with and without Chronic Kidney Disease: An Update. *Kidney Dis.* **3**, 136–148 (2017).
120. Bockenbauer, D., Lopez-Garcia, S. C. & Walsh, S. B. Renal Tubular Acidosis. *Pediatr. Nephrol. Eighth Ed.* 903–928 (2022) doi:10.1007/978-3-030-52719-8_111.
121. Morsy, M. A. & Heeba, G. H. Nebivolol Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **118**, 449–455 (2016).
122. Xia, N. *et al.* Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 78–85 (2016).
123. Liu, H. *et al.* Improvement of thoracic aortic vasoreactivity by continuous and intermittent exercise in high-fat diet-induced obese rats. *Biomed. reports* **3**, 527–532 (2015).
124. Szasz, T., Bomfim, G. F. & Webb, R. C. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc. Health Risk Manag.* **9**, 105 (2013).
125. Moghadam, Z. M., Henneke, P. & Kolter, J. From Flies to Men: ROS and the NADPH Oxidase in Phagocytes. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
126. Jiang, F. *et al.* Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. *Redox Rep.* **16**, 223 (2011).
127. Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752 (2004).
128. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–13 (2017).
129. Sharifi-Rad, M. *et al.* Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* **11**, (2020).
130. Jia, X. J., Liu, L. X., Tian, Y. M., Wang, R. & Lu, Q. The correlation between oxidative stress level and intra-abdominal fat in obese males. *Med. (United States)* **98**, (2019).
131. Park, S. W. *et al.* Hydrogen peroxide induces vasorelaxation by enhancing 4-aminopyridine-sensitive Kv currents through S-glutathionylation. *Pflügers Arch.* -

- Eur. J. Physiol.* **467**, 285–297 (2015).
132. Noeman, S. A., Hamooda, H. E. & Baalash, A. A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* **3**, 1–8 (2011).
 133. Kolo, L. L., Westfall, T. C. & Macarthur, H. Nitric oxide decreases the biological activity of norepinephrine resulting in altered vascular tone in the rat mesenteric arterial bed. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, (2004).
 134. Zhou, X., Bohlen, H. G., Unthank, J. L. & Miller, S. J. Abnormal nitric oxide production in aged rat mesenteric arteries is mediated by NAD(P)H oxidase-derived peroxide. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **297**, H2227 (2009).
 135. Hashitani, H., Fukuta, H., Dickens, E. J. & Suzuki, H. Cellular mechanisms of nitric oxide-induced relaxation of corporeal smooth muscle in the guinea-pig. *J. Physiol.* **538**, 573 (2002).
 136. Walford, G. & Loscalzo, J. Nitric oxide in vascular biology. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 2112–2118 (2003).
 137. Sansbury, B. E. & Hill, B. G. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **0**, 383 (2014).
 138. Gruber, H. J. *et al.* Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int. J. Obes. (Lond)*. **32**, 826–831 (2008).
 139. Malech, H. L., Deleo, F. R. & Quinn, M. T. The Role of Neutrophils in the Immune System: An Overview. *Methods Mol. Biol.* **1124**, 3 (2014).
 140. Michailidou, Z., Gomez-Salazar, M. & Alexaki, V. I. Innate Immune Cells in the Adipose Tissue in Health and Metabolic Disease. *J. Innate Immun.* **14**, 4–30 (2022).
 141. Garbin, U. *et al.* Effects of Nebivolol on Endothelial Gene Expression during Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* **2008**, (2008).
 142. Perros, F. *et al.* Nebivolol for Improving Endothelial Dysfunction, Pulmonary Vascular Remodeling, and Right Heart Function in Pulmonary Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 668–680 (2015).
 143. Hussain, M., Saeed, M., Babar, M. Z. M., Atif, M. A. & Akhtar, L. Nebivolol Attenuates Neutrophil Lymphocyte Ratio: A Marker of Subclinical Inflammation in Hypertensive Patients. *Int. J. Hypertens.* **2017**, 1–6 (2017).
 144. Merchant, N. *et al.* Effects of nebivolol in obese African Americans with hypertension (NOAAH): markers of inflammation and obesity in response to exercise-induced stress. *J. Hum. Hypertens.* **25**, 196–202 (2011).
 145. Howlett, J. G. Nebivolol: Vasodilator Properties and Evidence for Relevance in Treatment of Cardiovascular Disease. *Can. J. Cardiol.* **30**, S29–S37 (2014).

146. Celik, T. *et al.* Comparative effects of nebivolol and metoprolol on oxidative stress, insulin resistance, plasma adiponectin and soluble P-selectin levels in hypertensive patients. *J. Hypertens.* **24**, 591–596 (2006).
147. Subramanian, V. & Ferrante, A. W. Obesity, inflammation and macrophages. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.* **63**, 151–162 (2009).
148. Cai, Z., Huang, Y. & He, B. New Insights into Adipose Tissue Macrophages in Obesity and Insulin Resistance. *Cells* **11**, (2022).
149. Castoldi, A. *et al.* The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front. Immunol.* **6**, 170492 (2016).
150. Chakarov, S., Blériot, C. & Ginhoux, F. Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. *J. Exp. Med.* **219**, (2022).

9. Anexo

9.1. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Centro Colaborador da OPAS/OMS para o Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3315.3382 - 55 16 3315.3381 - Fax: 55 16 3315.0518
www.eerp.usp.br - eerp@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - ceua@eerp.usp.br

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do *nebivolol* sobre o aumento da pressão arterial e alteração do fenótipo anti-contrátil do tecido adiposo perivascular durante a obesidade", registrada sob nº 21.1.304.22.3, sob a responsabilidade de Carlos Renato Tirapelli e Victor Oliveira Assis, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA-EERP/USP), em sua 69ª reunião ordinária realizada em 02/09/2021.

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	20/10/2021 a 20/10/2023
Espécie/Linhagem/Raça	Wistar Hannover
Nº de animais	128
Peso/Idade	260-280 gramas / 50-70 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 03 de setembro de 2021.

Prof. Dr. Angelita Maria Stabile
Vice-Presidente da CEUA-EERP/USP