

Alecsander Fabricio Moreira Bressan

**MIRABEGRON PRESERVA O EFEITO HIPOCONTRÁTIL DO PVAT AÓRTICO
DURANTE A OBESIDADE**

Ribeirão Preto

2023

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

Alecsander Fabricio Moreira Bressan

**MIRABEGRON PRESERVA O EFEITO HIPOCONTRÁTIL DO PVAT AÓRTICO
DURANTE A OBESIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Dr. Fernando Silva Carneiro

Ribeirão Preto

2023

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

Bressan, Alecsander Fabricio Moreira

Mirabegron preserva o efeito hipocontrátil do PVAT aórtico durante a obesidade. Ribeirão Preto, 2023.

128 p. : 28 il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Silva Carneiro, Fernando.

1.Mirabegron. 2. Tecido adiposo perivascular. 3. Obesidade. 4. Receptor adrenérgico tipo beta 3.

Bressan, A.F.M. Mirabegron preserva o efeito hipocontrátil do PVAT aórtico durante a obesidade. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração em farmacologia.

Aprovado () Reprovado ()

____/____/____

Data

Banca examinadora:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às pessoas de Esmar Moreira e José Antonio, que atuaram
como a roda do leme, nessa travessia.

AGRADECIMENTOS

Realiza-se um agradecimento à parcela da comunidade científica que contribuiu indiretamente com os resultados aqui apresentados. Expressa-se o reconhecimento à competência do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) na formação de profissionais. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), fundação do Ministério da Educação realiza-se um agradecimentos por todo suporte científico e financeiro.

Faz-se um agradecimento muito especial ao orientador do trabalho, o professor Dr. Fernando Silva Carneiro, que disse sim à orientação e foi responsável pelas melhores discussões científicas realizadas no desenvolvimento deste projeto.

Reconhece-se a competência do corpo técnico dos laboratórios pelo qual o trabalho foi desenvolvido, representado pelas pessoas de Giuliana Bertozi e Carla Pavan, que nunca abdicaram esforços para providenciar a estrutura necessária para o desenvolvimento das atividades laboratoriais.

Realiza-se um agradecimento pela disposição das alunas de iniciação científica Beatriz Rodrigues e Beatriz Carneiro, que se fizeram presentes executando as técnicas laboratoriais necessárias.

Um agradecimento à Professora Rita Tostes pela disposição em colaborar no desenvolvimento de habilidades científicas.

Gratidão pela disposição e colaboração de todo o grupo de cientistas que se fizeram presente no dia a dia laboratorial formado pelas pessoas de Aline Fedoce, Allan Mendes, Carina Pedersoli, Carla Pacheco, Cintia Vieira, Daniel Rodrigues, Diane Rassi, Fernanda Minelli, Fernanda Rodrigues, Jeimison Duarte, José Teles, Josiane Fernandes, Juliana Bolsoni, Juliano Vilela, Julio Neto, Mirele Resende, Paula Barros, Rafael Fais, Rafael Menezes, Sara Hott, Tiago Januário e Tiago Tomazine.

Expressa-se gratidão ao corpo técnico do departamento de Farmacologia da FMRP-USP, nas pessoas de Afonso Paulo, Ana Kátia, Carla Pavan, Daoud Hibráhim, Diva Amábile, Eleni Luiza, Eliane, Eliane Aparecida, Gislaine Marques, Giuliana Bertozi, Ieda Regina, Ivanilda Fortunato, Waldik Ramon, Laura Heloíse, Marcela Grando, Marco

Antonio Ribeiro, Marcos Antônio de Carvalho, Maria Inês, Orlando Mesquita, Sandra de Oliveira, Sérgio Rosa, Vania Fernandes e Tadeu Franco Vieira (*in memoriam*). Gratidão também, ao Carlos Alberto (Beto) do Departamento de Fisiologia da FMRP-SP.

Faz-se um reconhecimento à competente atuação da secretaria departamental, representada nas pessoas de Gislaine Marques e Waldik Ramon.

O reconhecimento e agradecimento à toda equipe responsável pela higienização do ambiente departamental, em especial à Lilian. Um agradecimento a Walkiria, funcionária da cantina da FMRP autora de um incomparável Caffè Macchiato, à Maristela funcionária da recepção do prédio central da FMRP, por agilizar algumas demandas por telefone.

Por fim, realiza-se um agradecimento particular a quem possa se interessar na leitura deste texto.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ABCA1	Transportador transmembranar dependente de ATP
AC	Adenilato ciclase
AKT	Proteína quinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANG II	Angiotensina II
ApoA1	Apolipoproteína A1
AST	Aspartato aminotransferase
AT1	Receptor de ANG II tipo I
ATP	Trifosfato de adenosina
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxygenase
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
cm	Centímetros
CMLV	Células musculares lisas vasculares
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CT	Grupo experimental controle
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DH	Dieta hiperlipídica
DHE	Dihidroetidina
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Dieta padrão
ECA	Enzima conversora de angiotensina
eNOS	Sintase endotelial de óxido nítrico

EPM	Erro padrão da média
ROS	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA
g	Grama
GC	Guanilato ciclase
Gi	Proteína G inibitória
GPCR	Receptores acoplados à proteína G
Gs	Proteína G estimulatória
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₂S	Sulfeto de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC	Insuficiência cardíaca
IFCC	Federação Internacional de Química Clínica e Medicina laboratorial
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
Kcal	Quilocaloria
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
L/h	Litros por hora
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
LTDA	Sociedade de Responsabilidade Limitada
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MBG	Mirabegron
mc	Massa corporal
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
mg	Miligrama
MMP	Metaloproteinases de matriz

mN	Milnewton
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOR	Noradrenalina
O₂	Oxigênio
OB	Grupo experimental obeso
P⁻	Secções arteriais desprovidas de PVAT
P⁺	Secções arteriais com PVAT preservado
pA₂	Logaritmo negativo da concentração molar do antagonista que reduz o efeito do agonista à 50%
pEC₅₀	Logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% de resposta máxima
pH	Potencial hidrogeniônico
PKG	Proteína quinase G
pM	Picomolar
PMP	Peso molecular padrão
PPAR-γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PVAT	Tecido adiposo perivascular
Raα	Receptor adrenérgico tipo alfa
RAβ	Receptor adrenérgico tipo beta
Rmáx	Resposta contrátil máxima
rpm	Rotação por minuto
SBH	Síndrome da bexiga hiperativa
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TXA₂	Tromboxano A ₂

U.A.	Unidade arbitrária
U/L	Unidade de massa atômica por litro
VEI	Veículo
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secção transversal da artéria aorta torácica de camundongo, com PVAT preservado. Coloração com hematoxilina e eosina.	26
Figura 2. Estrutura do RA β 3	36
Figura 3. Massa corporal (a), índice de Lee (b), consumo de ração (c) e ingestão calórica (d).....	57
Figura 4. Atividade da AST e da ALT e concentração sérica de colesterol total, HDL e LDL.	59
Figura 5. Glicemia após a privação alimentar e do TOTG.	60
Figura 6. Efeito do PVAT e da dieta na resposta contrátil à NOR.....	61
Figura 7. Efeito da administração do MBG na resposta contrátil à NOR.	62
Figura 8. Influência do NO e da sinalização mediada pelo RA β 3 na resposta contrátil à NOR de secções provenientes do grupo OB VEI e OB MBG.....	63
Figura 9. Razão do conteúdo proteico da eNOS _f ^{ser1177} pela eNOS _t no PVAT.....	65
Figura 10. Conteúdo proteico do RA β 3 no PVAT.	66
Figura 11. Conteúdo proteico do RA β 1 no PVAT.	67
Figura 12. Conteúdo proteico do RA β 2 pela sua detecção em dois pesos moleculares no PVAT.....	68
Figura 13. Conteúdo proteico da GC α e da GC β na artéria aorta torácica.	69
Figura 14. Concentração sérica de nitrito.	70
Figura 15. Conteúdo proteico da UCP1 no PVAT.	71
Figura 16. Geração de ROS no PVAT.	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Componentes da ração hipercalórica (9,6 kcal/g).	477
Quadro 2. Sistemas de detecção para determinações de analitos em soro.....	49
Quadro 3. Protocolo de western blot de acordo com alvo proteico.	52
Quadro 4. Anticorpos utilizados na técnica de western blot.	53
Quadro 5. Massa corporal e peso dos tecidos adiposos.	58
Quadro 6. Valores da R_{max} e do pEC_{50} dos estudos em secções aórticas.....	644

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agonistas do RA β 3 testados em estudos clínicos.....	38
Tabela 2. Tecidos que expressam o RA β 3, vias de sinalização e potencial terapêutico.	38
Tabela 3. Mirabegron em estudos clínicos.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Cenário epidemiológico da obesidade.....	21
1.2 Variáveis no diagnóstico da obesidade.....	22
1.3 Tipos de tecido adiposo.	23
1.4 Influência do PVAT na homeostase vascular.	26
1.5 Os vasos sanguíneos como destinatários de desordens do tecido adiposo... 29	
1.6 Desordens do PVAT durante a obesidade e implicações vasculares.....	30
1.7 Abordagens para melhorar a função do PVAT.....	33
1.7.1 Perda de peso.	33
1.7.2 Exercício físico.....	33
1.7.3 Abordagem farmacológica.....	33
1.8 O RAβ3 como alvo farmacológico.....	34
1.9 Aspectos farmacológicos do MBG.	38
1.10 Segurança cardiovascular do MBG e em condições de obesidade.....	40
1.11 Justificativa.....	41
1.12 Hipótese.	42
2. OBJETIVO	43
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
2.2.1 Determinar se a obesidade induz prejuízo do efeito hipocontrátil do PVAT.....	44
2.2.2 Determinar se o tratamento com MBG modula a via do NO no PVAT....	44
2.2.3 Determinar se o tratamento com MBG contribui para a manutenção do efeito hipocontrátil do PVAT e se o RAβ3 participa nesse contexto.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Animais utilizados no estudo.	46
3.2 Dieta dos camundongos e administração do MBG.....	46

3.3 Determinação da massa corporal dos camundongos e da quantidade de ração consumida.	47
3.4 Eutanásia, obtenção de sangue e de tecidos dos camundongos.	47
3.5 Determinação do índice de Lee e do peso de tecidos adiposos dos camundongos.....	48
3.6 Obtenção do soro.....	48
3.7 Determinação sérica da atividade das enzimas AST e ALT e da concentração de colesterol total, HDL e LDL.	48
3.8 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).	49
3.9 Estudo da resposta contrátil de secções da artéria aorta torácica à NOR.	49
3.10 Protocolo de western blot.	50
3.10.1 Extração de proteínas totais do PVAT.	50
3.10.2 Extração de proteínas totais da artéria aorta torácica.....	51
3.10.3 Quantificação de proteínas totais	51
3.10.4 Eletroforese e transferência de proteínas.....	52
3.11 Determinação da concentração sérica de nitrito.	53
3.12 Determinação da fluorescência de DHE no PVAT.....	53
3.13 Representação gráfica dos resultados.....	54
3.14 Análise estatística.....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1 Determinação da massa corporal, do índice de Lee, do consumo de ração e da ingestão calórica.	57
4.2 Determinação da massa corporal e do peso úmido de determinados tecidos gordurosos.....	59
4.3 Determinação sérica da atividade das enzimas AST e ALT e da concentração de colesterol total, HDL e LDL.	59
4.4 Determinação da glicemia após a privação alimentar e do TOTG.....	60
4.5 Determinação da resposta contrátil de secções aórticas à adição cumulativa de NO	61
4.5.1 Efeito do PVAT e da dieta.....	61

4.5.2 Efeito do tratamento com MBG.	62
4.5.3 Influência do NO e da sinalização mediada pelo RA β 3.	63
4.6 Western blot e quantificação sérica de nitrito.....	66
4.6.1 Análise da razão do conteúdo proteico da eNOS _f ^{ser1177} pela eNOS _t no PVAT.....	65
4.6.2 Determinação do conteúdo proteico do RA β 3 no PVAT.	66
4.6.3 Determinação do conteúdo proteico do RA β 1 no PVAT.	67
4.6.4 Determinação do conteúdo proteico do RA β 2 no PVAT.....	69
4.6.5 Determinação do conteúdo proteico da GC α e da GC β na aorta.....	69
4.5.6 Determinação da concentração sérica de nitrito dos camundongos.	70
4.7 Determinação do conteúdo proteico da UCP1 no PVAT.	71
4.8 Determinação da geração de ROS no PVAT.....	72
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXO A	132
ANEXO B.....	133
APÊNDICE A	1340
APÊNDICE B.....	1362
APÊNDICE C.....	1373

RESUMO

Bressan, A.F.M. Mirabegron preserva o efeito hipocontrátil do PVAT aórtico durante a obesidade. [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2023.

O tecido adiposo perivascular (PVAT) que está localizado ao redor da artéria aorta, das artérias coronárias, dos vasos de resistência e da vasculatura do sistema musculoesquelético, exerce um efeito hipocontrátil na vasculatura adjacente, em condições de saúde. O receptor adrenérgico tipo β_3 ($RA\beta_3$) exerce importante contribuição para a função hipocontrátil do PVAT quando estimulado pela noradrenalina (NOR). Durante a obesidade em humanos e em camundongos o PVAT perde seu efeito hipocontrátil. Ainda não há uma terapia eficaz, para prevenção da disfunção ou restabelecimento da função do PVAT em condições de obesidade. O mirabegron (MBG) é um fármaco agonista do $RA\beta_3$ e demonstrou ser um medicamento seguro quando se refere a função cardiovascular em condições de obesidade. Este estudo, testa a hipótese de que o tratamento com MBG contribui para a manutenção do efeito hipocontrátil do PVAT aórtico torácico durante a obesidade experimental, via aumento da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS). Para testar essa hipótese, camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica foram utilizados, para se estudar a repercussão da administração do MBG no efeito hipocontrátil do PVAT da artéria aorta torácica. Camundongos obesos e controles receberam veículo (VEI) ou 10 mg/kg de MBG por 30 dias. Em secções arteriais aórticas, determinou-se a resposta contrátil à NOR e a influência do PVAT. O L-NAME (inibidor não seletivo das sintases do óxido nítrico) e o SR59230A (antagonista do $RA\beta_3$) foram utilizados para estudo da influência do óxido nítrico (NO) e do $RA\beta_3$. O conteúdo proteico da $eNOS_f^{ser1177}$ (eNOS fosforilada no resíduo 1177 de serina), $eNOS_t$ (eNOS total) dos $RA\beta_s$ no PVAT foi determinado. Mensurações do ganho de massa corporal, da concentração sérica de lipídeos e glicose, foram realizadas. Os resultados demonstraram que o MBG preveniu a perda do efeito hipocontrátil do PVAT durante a obesidade. O MBG aumentou a razão do conteúdo proteico da $eNOS_f^{1177}/eNOS_t$ e do $RA\beta_3$ no PVAT. A síntese do NO e o agonismo do $RA\beta_3$ são importantes no mecanismo de preservação da função hipocontrátil do PVAT exercida pelo MBG. O MBG preveniu o aumento da concentração sérica da LDL e a diminuição da tolerância à glicose durante a obesidade. O presente estudo traz suporte para a apresentação do MBG como um fármaco capaz de promover a manutenção do efeito hipocontrátil do PVAT aórtico torácico durante a obesidade.

Palavras-chave: Mirabegron (MBG), obesidade, tecido adiposo perivascular (PVAT) e receptor adrenérgico tipo β_3 ($RA\beta_3$).

ABSTRACT

Bressan, A.F.M. Mirabegron preserves the hypocontractile effect of aortic PVAT during obesity. [Thesis (Pharmacology)]. Sao Paulo: Pharmacology Department, Ribeirao Preto Medical School, Sao Paulo University; 2023.

Perivascular adipose tissue (PVAT), located around the aorta, coronary arteries, resistance vessels, and vasculature of the skeletal muscle system, exerts a hypocontractile effect on adjacent vasculature under healthy conditions. The β_3 -adrenergic receptor (β_3 AR) plays an important contribution to the hypocontractile function of PVAT when stimulated by noradrenaline (NOR). During obesity in humans and mice, PVAT loses its hypocontractile effect. There is still no effective therapy for preventing dysfunction or restoring PVAT function in obesity conditions. Mirabegron (MBG) is a β_3 AR agonist drug that showed a safe profile for the cardiovascular function in obesity conditions. We hypothesize that MBG contributes to maintaining the hypocontractile effect of thoracic aortic PVAT during obesity, via increased endothelial nitric oxide synthase (eNOS). High-fat diet obese mice were used to study the effect of MBG treatment on the hypocontractile effect of PVAT in the thoracic aorta artery. Obese and control mice received vehicle (VHE) or 10 mg/kg MBG for 30 days. In aortic arterial sections, the contractile response to NOR and the influence of PVAT were determined. L-NAME (non-selective nitric oxide synthase inhibitor) and SR59230A (β_3 AR antagonist) were used to study the influence of nitric oxide (NO) and β_3 AR. The protein expression of eNOS_{f^{ser1177}} (phosphorylated eNOS at serine residue 1177), eNOS_t (total eNOS) of β_3 ARs in PVAT was determined. Measurements of body mass gain, serum concentration of lipids and glucose were performed. The results demonstrated that MBG prevented the loss of the hypocontractile effect of PVAT during obesity. MBG increased the protein expression ratio of eNOS_{f^{ser1177}}/eNOS_t and β_3 AR in PVAT. NO synthesis and β_3 AR agonism are important to preserve the hypocontractile function of PVAT exerted by MBG. MBG prevented the LDL serum increase concentration and the decrease in glucose tolerance during obesity. The present study showed that: MBG preserves the hypocontractile effect of thoracic aortic PVAT during obesity.

Keywords: Mirabegron (MBG), obesity, perivascular adipose tissue (PVAT) and β_3 -adrenergic receptor (β_3 AR).

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cenário epidemiológico da obesidade.

A organização mundial de saúde categoriza o índice de massa corporal (IMC) por meio da equação $\frac{\text{massa corporal (kg)}}{\text{altura corporal (m)}^2}$. Quando essa razão encontra-se menor que 18,5 é indicativo de subpeso, em casos de resultado entre 18,5 e 24,9 o indivíduo pode ser considerado com peso normal. No entanto, considera-se sobrepeso quando esse índice está no intervalo de 25 a 29,9, ao passo que a obesidade é alcançada quando essa razão está igual ou superior a 30 ¹.

As consequências à saúde geradas pelo excesso de peso em indivíduos não é uma preocupação recente. No ano de 1930 o Dr. Louis Israel Dublin, biólogo e com treinamento em estatística, por meio de um artigo científico com dados adquiridos de uma seguradora de vida dos EUA (Estados Unidos da América), trouxe uma relação entre o peso corporal e a incidência de determinadas comorbidades, que poderiam diminuir a longevidade dos indivíduos. Com dados observados nas regiões Centro-Oeste, Leste e Sul dos EUA do período de 1887 a 1908 determinou-se que, a taxa de mortes se correlacionava positivamente com o número de indivíduos com excesso de peso ². O trabalho do Dr. Dublin, foi pioneiro e teve um papel fundamental na promoção de políticas públicas que visam a manutenção do peso corporal ideal.

O estudo de taxa global de doenças, realizado pelo instituto para avaliação e métrica em saúde, demonstrou que em 2019 o IMC elevado (≥ 25) esteve associado à diminuição do tempo de vida vivido com saúde de 160 milhões de pessoas (não discriminando gênero e faixa etária) em todo o mundo, e ainda, esteve correlacionado à aproximadamente 2,4 milhões de mortes em mulheres e a pouco mais de 2,3 milhões de mortes em homens ^{1,3}.

Em 2019 o número de mortes prematuras (quando se considera a expectativa de vida do indivíduo) relacionado ao IMC elevado foi em torno de 54,7 milhões para mulheres e em média 64,7 milhões para homens, em todo o mundo, considerando todas as faixas etárias ¹.

Utilizando dados do centro de pesquisa para despesas médicas (*Medical Expenditure Panel Survey*) dos EUA (Estados Unidos da América), Zachary JW e colaboradores realizaram uma análise da relação entre o IMC e os gastos com saúde, de

determinadas regiões (nordeste, centro-oeste, sul e leste) do país, observando o período de 2011 a 2016. Nesse estudo, foi observado que o IMC elevado esteve associado ao aumento de 1,86 dólar no gasto anual de despesas médicas individuais, somando aproximadamente 172 bilhões de dólares para toda a população com IMC elevado das regiões estudadas ⁴.

Em um levantamento, divulgado pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica, foi verificado que, em 2019, 407.589 pessoas foram diagnosticadas com obesidade mórbida, o que representava 3,14% das pessoas monitoradas com obesidade. Já em 2022, o número subiu para 863.083 brasileiros diagnosticados com obesidade mórbida, totalizando 4,07% da população. Houve um crescimento de 29,6% desse ponto percentual em apenas 4 anos ^{5,6}.

Dados atualizados pelo Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional (SISVAN), estimam que no Brasil, no mês de julho de 2023, 65,54% dos indivíduos adultos apresentaram algum grau de sobrepeso ⁶.

No Brasil, em 2018, o gasto do Sistema Único de Saúde para tratar doenças associadas à obesidade (não discriminando faixa etária) foi de aproximadamente 228 milhões de reais com mulheres e em torno de 143 milhões de reais com homens ⁷.

O conjunto de situações que levam indivíduos com IMC elevado a gastar com doenças associadas ao sobrepeso ou obesidade, não é o principal problema. A incapacitação pessoal gerada pelo IMC elevado causa prejuízo da qualidade de vida, seja no trabalho, no cotidiano ou no lazer. O elevado gasto com a saúde e o prejuízo da qualidade de vida dos indivíduos obesos, despertam o interesse em estudar alternativas que objetivam prevenir ou melhorar o estado de saúde desses indivíduos.

1.2 Variáveis no diagnóstico da obesidade.

A maioria dos indivíduos obesos possuem aumento da gordura visceral. No entanto, alguns indivíduos obesos pela classificação do IMC não possuem aumento da gordura visceral e o inverso pode ocorrer, onde indivíduos apesar de terem aumento da gordura visceral, não são classificados como obesos pelo IMC ⁸⁻¹⁰.

O acometimento de doença cardiovascular em indivíduos considerados com peso normal pelo IMC, leva a subnotificações na prática clínica entre os pacientes que apresentam excesso de gordura, mas não obesidade, classificados pelo IMC ^{11,12}.

No ano de 2013, as Diretrizes de Manejo da Obesidade emitida pela Associação Americana do Coração, recomendavam a medição da circunferência da cintura apenas em indivíduos com IMC elevado ¹³, excluindo a possibilidade de que pessoas com IMC normal teria algum risco específico relacionado à adiposidade. Por outro lado, tem sido demonstrado, uma importante influência do aumento de determinadas regiões adiposas, na saúde do indivíduo ^{14,15}. O consórcio para o estudo de fatores de risco emergentes, elaboraram um estudo que foi identificado que a circunferência da cintura e o IMC tiveram a mesma influência para o risco de doença cardiovascular ¹⁶.

O desenvolvimento de técnicas de imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética tem sido uma esperança, para o avanço do estudo da composição do corpo humano e acredita-se que seu uso será eficaz em trazer a relação do tamanho de determinados tecidos adiposos, com o risco de desenvolvimento de comorbidades ^{17,18}.

1.3 Tipos de tecido adiposo.

O tecido adiposo pode ser classificado no subconjunto branco, marrom ou bege. O tecido adiposo branco (TAB) é amplamente definido como subcutâneo (localizado sob a pele) e visceral/omental (localizado intra-abdominalmente, adjacente aos órgãos internos) ¹⁹. O tecido adiposo marrom (TAM) se caracteriza por sua morfologia e função, com grande quantidade de mitocôndrias que lhe dão uma aparência marrom ²⁰. O tecido adiposo bege representa uma classificação, na qual, os adipócitos marrons aparecem dentro dos depósitos de tecido adiposo classicamente conhecidos como branco ^{21,22}.

O TAB subcutâneo é o depósito mais proeminente em indivíduos magros e saudáveis, constituindo aproximadamente 80% de todo o tecido adiposo ²³. Esse tecido funciona como um isolante para evitar a perda de calor, como uma barreira contra a infecção dérmica e como uma camada protetora contra o estresse físico externo ¹⁹. Ele também desempenha a função de um reservatório fisiológico para o armazenamento

de energia, o qual pode tornar-se excessivo durante longos períodos de gasto energético limitado ²⁴.

As áreas ectópicas do TAB incluem a intra-hepática, a epicárdica, a perivascular, a gordura mesentérica (contíguo aos órgãos digestivos nas vísceras), a gordura omental (uma fina camada de gordura que se estende sobre os intestinos, fígado e estômago) e a gordura retroperitoneal que se localiza ao redor dos rins ¹⁹. O metabolismo da gordura visceral é altamente ativo e está constantemente liberando ácidos graxos livres na circulação portal ²⁵.

O outro tipo de tecido, é o TAM, que está localizado em regiões anatômicas distintas, que foram bem caracterizadas em roedores ²⁶. Ao absorver os ácidos graxos circulantes, o TAM funciona para gerar calor ao desacoplar a produção de energia química (ATP; trifosfato de adenosina) via fosforilação oxidativa em produção de calor (termogênese), contribuindo assim para a depuração dos triglicerídeos plasmáticos e a mitigação do armazenamento ectópico de lipídios ²⁰. O TAM representa entre 1% e 2% das reservas totais de gordura em humanos e está localizado principalmente nas regiões cervical, axilar e paravertebral ^{26,27}.

O TAM sintetiza e secreta fatores de crescimento de fibroblastos, neuregulina 4, e citocinas como a interleucina (IL)-6 ²⁸. O seu potencial endócrino é relativamente desconhecido, mas está claro que os fatores secretados exercem funções parácrinas e autócrinas. Embora a massa relativa do TAM em humanos e roedores seja pequena em comparação com outros depósitos adiposos, sua contribuição relativa para a saúde metabólica pode ser maior ²⁹.

Com estimulação prolongada, como ocorre na exposição ao frio, o tamanho e a atividade dos depósitos de TAM aumentam, um termo chamado recrutamento de TAM. O seu recrutamento está associado a uma maior proliferação e diferenciação de células precursoras de TAM ²⁶.

É importante salientar que, em condições particulares, alguns depósitos de TAB pode desenvolver características do TAM. Em roedores, o TAB subcutâneo é o depósito mais suscetível a essa diferenciação, enquanto em humanos é o TAB visceral ³⁰. Há uma lista de fatores que podem promover o desenvolvimento de características do TAM no

TAB, incluindo, exposição ao frio, exercício, cirurgia bariátrica, caquexia do câncer, queimaduras graves, bem como, componentes farmacológicos e dietéticos, como ácido linoleico conjugado, ácidos graxos de cadeia curta, capsaicina, extrato de chá verde não cafeinado, tiazolidinedionas e agonistas dos receptores adrenérgicos tipo β (RA β s) ³¹⁻⁴².

O terceiro tipo de tecido é denominado gordura bege, que é composto de adipócitos marrons dentro dos depósitos clássicos de adipócitos brancos. A gordura bege compartilha algumas características dos TAMs clássicos, como a redução sistêmica de triglicerídeos, e acredita-se que a gordura bege seja fisiologicamente distinta do TAM, com expressão diferencial de certos genes envolvidos no metabolismo, inflamação e transcrição ^{21,22}.

O TAM humano exibe morfologia e função semelhantes ao TAM e bege do roedor, complicando as comparações entre as duas espécies ⁴³⁻⁴⁵. Há um debate sobre a origem dos adipócitos bege, bem como, seu impacto na homeostase energética ^{21,46}. Os adipócitos beges podem surgir da adipogênese *de novo* de células progenitoras específicas, quando inicialmente estimulados pela exposição ao frio, mas depois, podem ficar “adormecidos” até serem estimulados novamente ⁴⁷. Essa teoria sugere que os adipócitos beges dormentes podem se tornar rápida e prontamente ativados quando necessário, lembrando uma resposta imunológica. Esse fluxo relativo entre células bege “adormecidas” e “ativas” pode ser o que foi anteriormente denominado “transdiferenciação” de adipócitos branco para bege ⁴⁷.

Alguns tecidos adiposos ectópicos, estão localizados em órgãos que regulam a homeostase cardiovascular. Os adipócitos epicárdicos que compartilham origens embrionárias com os adipócitos mesentéricos e omentais ⁴⁸, se encontram próximos ao miocárdio e permitem uma microcirculação compartilhada entre áreas do coração ⁴⁹. Acredita-se que os adipócitos epicárdicos sejam aproximadamente duas vezes mais metabolicamente ativos que outros depósitos de TAB, com capacidade mais alta de absorção e liberação de ácidos graxos devido à lipólise ⁵⁰.

Um outro tipo de gordura ectópica é a formada por adipócitos que envolvem os vasos sanguíneos, este é denominado tecido adiposo perivascular (PVAT). Já foi

reconhecido que o PVAT tem características que se assemelham tanto ao TAB quanto ao TAM ⁵¹.

O PVAT produz muitas moléculas bioativas que influenciam a reatividade vascular, incluindo adipocinas ⁵². O PVAT pode contribuir diretamente para o tônus vascular, além de desempenhar um papel de suporte na manutenção da estrutura do vaso. Tem sido sugerido que o PVAT da aorta torácica se assemelha ao TAM, enquanto o PVAT da aorta abdominal exibe propriedades tanto do TAM quanto do TAB ⁵².

1.4 Influência do PVAT na homeostase vascular.

O PVAT está localizado ao redor da artéria aorta, das artérias coronárias, dos vasos de resistência e da vasculatura do sistema musculoesquelético ⁵³⁻⁵⁵. Em artérias cerebrais, ele não pode ser verificado ⁵⁶. O PVAT é conectado à adventícia, sem estruturas laminares ou qualquer barreira organizada que os separe ⁵⁷, como demonstra a Figura 1.

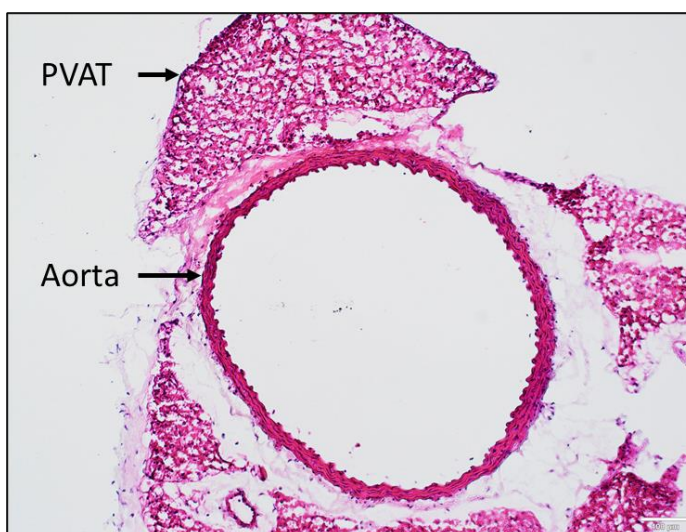


Figura 1. Secção transversal da artéria aorta torácica de camundongo, com PVAT preservado. Coloração com hematoxilina e eosina.

Pelo ponto de vista fisiológico, a primeira evidência da influência do PVAT na função dos vasos adjacentes se deu em 1991 por Edward Soltis e Lisa Cassis. Ao estudarem a resposta contrátil de segmentos aórticos à noradrenalina (NOR), observaram uma diminuição significativa da sensibilidade à NOR em segmentos com PVAT preservado, comparado à segmentos com PVAT removido. No mesmo estudo, foi sugerido que o PVAT exercia um importante efeito na recaptção celular de NOR ⁵⁸.

No ano de 2002, Matthias Löhn e colaboradores acrescentaram evidências de que a diminuição na sensibilidade à NOR em segmentos com PVAT preservado poderia estar associado à liberação de substâncias do PVAT com propriedades vasoativas. Foi verificado, que a transferência da solução que submergia segmentos com PVAT preservado ou do tecido periadventicial isolado, para segmentos pré-contraídos sem PVAT resultou em um rápido relaxamento ⁵⁹.

O efeito fisiológico do PVAT sobre a vasculatura passou então a ser denominado efeito hipocontrátil (ou anticontrátil). Já se sabe que esse efeito também pode ser verificado em resposta à endotelina 1 (ET-1), fenilefrina, angiotensina II (ANG II) e serotonina ^{60,61}. Por outro lado, o PVAT pode liberar fatores com ação dual (contrátil ou relaxante) como componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona ⁶² e ânion superóxido ⁶³.

Os fatores hipocontráteis liberados pelo PVAT podem ser denominados em vasodilatadores derivados do PVAT ou fatores relaxantes derivados do tecido periadventicial ^{51,64}.

A adiponectina é uma adipocina conhecida como uma substância vasodilatadora derivada do PVAT, que atua por meio de diferentes mecanismos afetando diretamente as células endoteliais e as células musculares lisas vasculares (CMLV). A adiponectina ativa a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), que é responsável pela fosforilação da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) ^{65,66}.

Uma outra adipocina com ação vascular é a leptina. A vasodilatação induzida pela leptina atua por meio de mecanismos dependentes e independentes do endotélio. Em grandes artérias, como a aorta, a leptina aumenta a vasodilatação dependente do endotélio, de forma semelhante à adiponectina, pela ativação da AMPK, que é responsável pela fosforilação da eNOS ⁶⁷. Em pequenas artérias, como a artéria mesentérica, o aumento da síntese de óxido nítrico (NO) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio, induzido pela leptina contribuem para a vasodilatação dependente do endotélio ⁶⁸.

O PVAT também pode produzir o sulfeto de hidrogênio (H_2S) que é um fator gasoso, que tem ação em células endoteliais e em CMLV, controlando o tônus vascular. A vasodilatação induzida por H_2S é causada pela ativação de canais de potássio ativados por cálcio, que leva à hiperpolarização da membrana celular, inativação de canais de Ca_2^+ tipo L dependentes de voltagem e uma diminuição na concentração de Ca_2^+ intracelular⁶⁹. O H_2S pode levar a uma diminuição dose-dependente do pH intracelular, o que causa a vasodilatação⁷⁰.

O PVAT é responsável pelo aumento da produção de NO por mecanismo direto. A eNOS está presente no PVAT, onde o NO é produzido e liberado diretamente à vasculatura⁷¹. Além disso, o NO pode ser um mediador regulado por adiponectina ou pelo agonismo do RA β 3^{72,73}.

Dentre os fatores liberados pelo PVAT que possuem papel dual na vasculatura se encontra o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é conhecido como um fator vasoconstritor e vasodilatador por diferentes mecanismos. O H_2O_2 tem propriedades permeáveis à membrana e difunde-se livremente para as CMLV, onde estimula a guanilato ciclase (GC), que desempenha o papel de receptor do NO e induz a vasodilatação via mobilização de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP)⁷⁴. Por outro lado, uma alta concentração de H_2O_2 estimula a ciclooxigenase (COX) e aumenta a concentração de Ca_2^+ intracelular podendo ativar contração⁷⁵.

Componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona estão presentes no PVAT aórtico e mesentérico, exceto a renina⁷⁶. A angiotensina 1-7 induz vasodilatação por mecanismos dependentes do endotélio, após a ativação dos receptores MAS, localizados no endotélio, a síntese do NO é aumentada⁷⁷. Por outro lado, a ANG II, induz vasoconstrição. Existem diferenças regionais na síntese de ANG II pelo PVAT, sendo maior no tecido adiposo mesentérico do que no tecido adiposo periaórtico⁶³.

Outro grupo de fatores derivados do PVAT são os produzidos pela COX, como tromboxano A2 (TXA2), alguns tipos de prostaglandinas (D2, E2, F2a, H2 e I) e a prostaciclina^{78,79}. Ambas as isoformas COX-1 e COX-2 estão presentes no PVAT⁷⁸.

Os fatores derivados da COX também têm efeito dual no tônus vascular. Em condições de homeostase, a serotonina estimula a produção de TXA2, que se caracteriza

por propriedades pró-contráteis e pró-inflamatórias ⁸⁰. A prostaciclina é conhecida como um vasodilatador, que reage adicionalmente com os seus receptores na vasculatura e desempenha um papel significativo na proteção contra a disfunção endotelial ^{81,82}.

O PVAT também é conhecido por liberar a NOR, que é o principal neurotransmissor do sistema nervoso simpático (SNS). A NOR induz vasoconstrição dos vasos pela ativação dos RA α s (receptores adrenergicos tipo alfa) localizados nas CMLV ⁸³. A NOR é liberada pelas terminações dos nervos simpáticos, que se espalham pelo tecido adiposo. É relatado que a NOR é adicionalmente sintetizada pelo PVAT independentemente da ativação do SNS ^{84,85}.

Sabe-se que a NOR pode ser armazenada no PVAT, e que a estimulação de tiramina induz um aumento da liberação de catecolaminas do PVAT ⁸⁵. Além disso, a NOR pode estimular a síntese de H₂O₂ pelo PVAT, que tem efeito hipocontrátil ⁸⁶. Bussey C. e colaboradores demonstraram que no PVAT de artérias mesentéricas de ratos, a estimulação do RA β 3 pela NOR leva à ativação da adenilato ciclase (AC) com aumento do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e a liberação do NO, indicando um importante papel do RA β 3 na função hipocontrátil do PVAT quando estimulado pela NOR ⁷³.

1.5 Os vasos sanguíneos como destinatários de desordens do tecido adiposo.

As alterações funcionais e estruturais do tecido adiposo (sem pormenorizá-lo), podem ser associadas com maior volume sanguíneo, aumento do débito cardíaco e redução da resistência vascular sistêmica ⁸⁷.

Sabe-se que a gordura pericárdica pode influenciar no risco de doença cardiovascular aterosclerótica e insuficiência cardíaca (IC) ^{88,89}. Anormalidades na microvasculatura coronariana, um regulador chave do fluxo sanguíneo coronariano na isquemia miocárdica, pode ser verificado em indivíduos com obesidade ^{90,91}. Estudos prospectivos, indicam que a perda de peso por cirurgia bariátrica tem sido associada à melhorias na função microvascular coronariana ⁹².

Segmentos de aorta de ratos SHR (ratos espontaneamente hipertensos) pré-hipertensos apresentam redução do efeito hipocontrátil do PVAT precedendo o estabelecimento da hipertensão ^{93,94}.

Em modelos experimentais de aterosclerose, uma mudança no conteúdo e expressão de proteínas e genes no PVAT associadas ao dano oxidativo e à inflamação pode ser observada. Esse perfil inflamatório local inclui aumento da proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1), da IL-6 e da proteína 2 semelhante à angiopoietina, estimulando a migração de células imunológicas e acelerando a hiperplasia da neoíntima ⁹⁵⁻⁹⁸.

Em situações de sepse, a disfunção do PVAT foi sugerida. O sistema vascular durante a sepse diminui a resposta aos vasoconstritores e a consequência pode ser uma hipotensão profunda no indivíduo ⁹⁹. No entanto, em animais com sepse, o efeito hipocontrátil do PVAT é aumentado. Segmentos de aorta com PVAT preservado mostraram diminuição na resposta à NOR, fenilefrina e serotonina, nessa condição ^{99,100}. Esses dados evidenciam que o mesmo efeito hipocontrátil do PVAT pode se tornar prejudicial em determinadas situações, evidenciando que a contribuição do PVAT para a função vascular pode ser ainda mais complexa.

1.6 Desordens do PVAT durante a obesidade e implicações vasculares.

As primeiras evidências do prejuízo da ação vascular do PVAT associado ao aumento de adiposidade, foram descritas no ano de 2005, em estudos experimentais ¹⁰¹. A exposição pré-natal à nicotina aumentou a adiposidade e causou uma alteração na função hipocontrátil do PVAT em ratos machos ¹⁰¹.

Camundongos com obesidade induzida por dieta hipercalórica, perdem o efeito hipocontrátil do PVAT e isso se correlaciona com o aumento da pressão arterial ^{102,103}. A perda do efeito hipocontrátil do PVAT também pode ser verificado em animais com obesidade espontânea e no modelo ob/ob ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

A obesidade induzida por dieta de “cafeteria”, em ratos, aumenta a produção de H₂S pelo PVAT à curto prazo (1 mês de dieta) e isso está associado ao aumento do efeito hipocontrátil do PVAT, enquanto a longo prazo (3 meses de dieta) observa-se a redução da produção de H₂S e de seus efeitos hipocontráteis ¹⁰⁷. Em pessoas com

excesso de peso e em pacientes com diabetes tipo 2, os níveis plasmáticos de H₂S são reduzidos ¹⁰⁸.

Pacientes obesos apresentam diminuição da concentração de adiponectina na gordura subglútea em comparação com indivíduos eutróficos ¹⁰⁹. Níveis reduzidos de adiponectina são encontrados no PVAT ¹¹⁰ e no plasma de indivíduos obesos ¹¹¹ e em amostras de PVAT de animais com diferentes tipos de obesidade, incluindo os camundongos ob/ob ¹⁰⁴, os camundongos db/db ¹¹² e os camundongos com obesidade induzida por dieta ^{113,114}.

Na obesidade, a produção de leptina está aumentada no PVAT e no tecido adiposo visceral ¹¹⁵. Embora a leptina tenha um efeito hipocontrátil ao induzir a síntese do NO, a exposição prolongada do endotélio à leptina induz o resultado inverso ao diminuir a biodisponibilidade do NO ¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Em coelhos hipercolesterolêmicos, as artérias coronárias epicárdicas circundadas por PVAT desenvolvem aterosclerose, enquanto os segmentos intramiocárdicos (que não possuem PVAT) dessas mesmas artérias permanecem inalterados ¹¹⁹.

Uma característica comum entre hipertensos obesos e hipertensos magros é o perfil inflamatório no tecido adiposo ^{120,121}. O PVAT contém uma rica população de células imunológicas inatas e adaptativas que se alteram na obesidade ¹²².

Os macrófagos representam uma grande proporção da população de células imunológicas no PVAT. Na obesidade, os macrófagos são a principal fonte do TNF α (Fator de necrose tumoral alfa) e IL-6 ¹²³. Os eosinófilos que estão presentes em grande número no PVAT saudável podem estar reduzidos na obesidade ¹²⁴.

O número de neutrófilos ¹²⁵ e de células T e B ¹²⁶⁻¹²⁸ pode se elevar no PVAT durante a obesidade, contribuindo para o perfil pró-inflamatório.

Em pequenas artérias de pacientes obesos a liberação basal do NO está reduzida em comparação com indivíduos não obesos. Essa redução na produção basal do NO induzida pela obesidade é evidente em artérias contendo PVAT, mas não em artérias desprovidas de PVAT ¹²⁹, apoiando o conceito de que uma produção reduzida

do NO pelo PVAT está envolvida na perda do efeito hipocontrátil do PVAT durante a obesidade.

Embora uma superprodução adaptativa do NO a partir do PVAT mesentérico tenha sido observada na fase inicial da obesidade induzida por dieta em camundongos C57BL6J ¹³⁰, um tempo mais longo em dieta hiperlipídica diminui a produção do NO ^{131,132}.

A inibição farmacológica da síntese do NO, aumenta a contração induzida por NOR nas artérias mesentéricas com PVAT e sem endotélio de ratos saudáveis. No entanto, esse efeito da inibição da síntese do NO é perdido em segmentos com PVAT de animais obesos induzidos por dieta ^{131,133}. Indicando que a obesidade reduz a produção de NO pelo PVAT a um nível que não é funcionalmente relevante.

Vários mecanismos moleculares podem ser responsáveis pela redução da síntese do NO pelo PVAT na obesidade, uma expressão reduzida da eNOS foi relatada no PVAT mesentérico de ratos ¹³³ e de camundongos ¹³⁴ obesos induzidos por dieta.

Há evidências de que, no PVAT da aorta torácica de camundongos obesos induzidos por dieta, a função da eNOS está prejudicada, por desacoplamento, bem como, redução da sua fosforilação no resíduo de serina¹¹⁷⁷ ¹³². A redução do NO proveniente do PVAT também pode ser parcialmente atribuída a uma deficiência da síntese de adiponectina no PVAT, que normalmente estimula a atividade da eNOS nos adipócitos adjacentes ¹³⁵.

Alguns estudos são realizados a fim de se avaliar o papel do PVAT na regulação da função vascular em humanos, aqui estão descritos estudos que utilizaram pequenas artérias de amostras de biópsia de gordura glútea/visceral ou materiais de enxerto de *bypass* coronário: o efeito hipocontrátil do PVAT humano foi demonstrado para a artéria mamária interna ¹³⁶⁻¹³⁸, a veia safena ¹³⁹⁻¹⁴¹ e para pequenas artérias ¹⁴²⁻¹⁴⁴. Em pequenas artérias humanas retiradas de biópsias de gordura subcutânea de glúteos, o efeito hipocontrátil do PVAT é completamente perdido em pacientes obesos ^{145,146}.

Durante a obesidade, o PVAT sofre hipóxia, estresse oxidativo e inflamação, levando à regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias ¹⁴⁶, produção aumentada de espécies reativas do oxigênio (ROS; espécies reativas de oxigênio) e regulação negativa

de enzimas antioxidantes ¹⁴⁷. Pode haver redução da liberação de adipocinas vasodilatadoras ¹⁴⁸, bem como, a diminuição da produção de NO a partir do PVAT ¹⁴⁹.

A incubação *in vitro* de artérias de indivíduos obesos com superóxido dismutase e catalase restaura os efeitos anticontráteis do PVAT ^{109,145}. Além disso, a disponibilidade reduzida do NO e o aumento da sinalização de ET-1 que são encontrados nas artérias de pacientes obesos, podem ser revertidos pela remoção do PVAT ¹⁴².

1.7 Abordagens para melhorar a função do PVAT.

1.7.1 Perda de peso.

A perda de peso sustentada induzida pela restrição calórica em ratos obesos leva a uma melhora na função do PVAT associada a uma reversão da hipertensão induzida pela obesidade, restauração do tamanho dos adipócitos, e restabelecimento da função da eNOS local ¹³³. Em humanos, a cirurgia bariátrica restaura a atividade hipocontrátil do PVAT em indivíduos obesos ¹⁴⁵.

1.7.2 Exercício físico.

O treinamento físico executado por nado forçado da 5ª à 10ª semana de dieta hiperlipídica em camundongos, foi associado à prevenção da disfunção, redução da inflamação e aumento do conteúdo do RAβ3 no PVAT de artérias mesentéricas desses animais ¹⁵⁰.

O treinamento físico executado por esteira concomitante a ingestão de dieta hiperlipídica em ratos, foi associado a prevenção da disfunção e aumento da concentração de H₂S no PVAT ¹⁵¹.

1.7.3 Abordagem farmacológica.

Em modelo de rato com obesidade e síndrome metabólica, o tratamento com a rosiglitazona [agonista do PPARγ (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama)] aumenta a sensibilidade à insulina, reduz a concentração de insulina em jejum e a concentração de triglicédeos, aumenta a concentração do H₂S no PVAT e melhora o efeito hipocontrátil do PVAT em segmentos aórticos ¹⁵².

A administração de atorvastatina lipofílica em animais saudáveis aumenta a concentração de H₂S no PVAT ¹⁵³. Uma meta-análise demonstrou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de adiponectina após a terapia com estatina em

indivíduos obesos ¹⁵⁴. A administração de agonistas do receptor canabinóide CB1 em animais saudáveis, são eficazes em aumentar a concentração de H₂S no PVAT inibindo sua oxidação mitocondrial ¹⁵².

A atorvastatina e os agonistas do receptor canabinóide CB1, ainda não foram testados para estudo de seus efeitos sobre o PVAT durante obesidade.

Antagonistas de citocinas também representam abordagens possíveis. A incubação *ex vivo* com o anticorpo anti-TNF α (infliximab) melhorou a função do PVAT e a produção do NO pelo PVAT em pequenas artérias isoladas de pacientes obesos ¹⁴².

O tratamento com melatonina por 8 semanas melhora a função hipocontrátil do PVAT em camundongos ob/ob ¹⁵⁵. A melatonina reduz a expressão de ET-1, IL-6 e metaloproteinases de matriz (MMP) 2 e 9 na aorta, diminui os níveis do TNF α na gordura visceral e aumenta o conteúdo de adiponectina e de seu receptor no PVAT ¹⁵⁵.

O tratamento *in vitro* do PVAT da aorta torácica de rato com ativadores da AMPK como o salicilato, metformina, resveratrol ou diosgenina regula negativamente a expressão de fatores pró-inflamatórios (TNF α , IL-6 e MCP-1) e aumenta as moléculas anti-inflamatórias (adiponectina e PPAR γ) no PVAT ^{156,157}. Isso está associado a uma melhora na fosforilação da eNOS e na função hipocontrátil do PVAT ^{156,157}.

A perda do efeito hipocontrátil do PVAT observada durante a hipóxia pode ser evitada pela incubação com o captopril [inibidor da ECA (enzima conversora de angiotensina)], com o termisartan [antagonista do receptor AT1 (receptor de ANG II tipo I)] ¹⁵⁸, ou com a eplerenona (antagonista do receptor de aldosterona) ¹⁵⁹.

1.8 O RA β 3 como alvo farmacológico.

Logo após a subdivisão dos RA β s nos subtipos 1 e 2, ficou claro que o perfil farmacológico de algumas respostas aparentemente mediadas por RA β s não representava nenhum desses dois subtipos ¹⁶⁰. No entanto, a existência de um terceiro subtipo, não foi universalmente aceita até ele ser clonado pela primeira vez em 1989 por Emorine L. e colaboradores ¹⁶¹.

Desde então, a expressão do RA β 3 tem sido relatada em vários tecidos revelando, total ou parcialmente, novos detalhes sobre suas vias de sinalização e sobre a variedade de funções que ele medeia. Aspectos do RA β 3 foram descritos envolvendo

a melhora da função de contenção urinária ¹⁶², a redução da massa adiposa ¹⁶³ e algum envolvimento em processos inflamatórios ^{164,165}, abrindo caminho para aplicações terapêuticas potenciais. O agonista do RA β 3 mirabegron (MBG) é o primeiro dessa classe de compostos que foi aprovado para o tratamento da síndrome da bexiga hiperativa (SBH) e uma das poucas alternativas aos medicamentos anticolinérgicos ¹⁶⁶.

O gene que codifica o RA β 3 foi identificado em várias espécies, como rato ¹⁶⁷, camundongo ¹⁶⁸, bovinos, ovinos, caprinos ¹⁶⁹ e cães ¹⁷⁰. Em humanos, o gene está localizado no cromossomo 8 e compartilha uma identidade de 51% e 46% com sequências de aminoácidos do RA β 1 e do RA β 2, respectivamente. Isso é principalmente limitado aos domínios transmembranares e regiões das alças intracelulares, partes do receptor envolvido respectivamente na interação com o ligante e nas interações da proteína G ^{171,172}.

Os RA β 3s entre ratos e humanos são 81% idênticos, com maior homologia nos domínios transmembranares, e menor na cauda C-terminal e na terceira alça intracelular. Consistentemente, suas regiões C-terminais diferem em sequência e comprimento, variando de 6 (humano) a 12 (camundongo e rato) resíduos adicionais. O gene do RA β 3 também contém íntrons. O número de éxons e íntrons dos genes humanos e de roedores difere, o gene do RA β 3 humano é composto por dois éxons e um único íntron enquanto no camundongo, existem três éxons e dois íntrons ¹⁷³.

Apesar da presença de íntrons, nenhuma variante de *splicing* foi descrita para o gene do RA β 3 humano, enquanto duas foram caracterizadas em camundongos ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

O gene do RA β 3 codifica uma única cadeia peptídica longa de 408 resíduos de aminoácidos que, juntamente com RA β 1 e RA β 2, pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) caracterizados por conterem sete domínios transmembranares, com três alças intracelulares e três extracelulares. A região N-terminal do RA β 3 é extracelular e glicosilada, enquanto que a região C-terminal é intracelular. Ao contrário do RA β 1 e do RA β 2, o RA β 3 não possui sítio para fosforilação pela proteína quinase A (PKA) e por quinases dos GPCRs, tornando-o menos suscetível à dessensibilização; Figura 2 ^{172,177,178}.

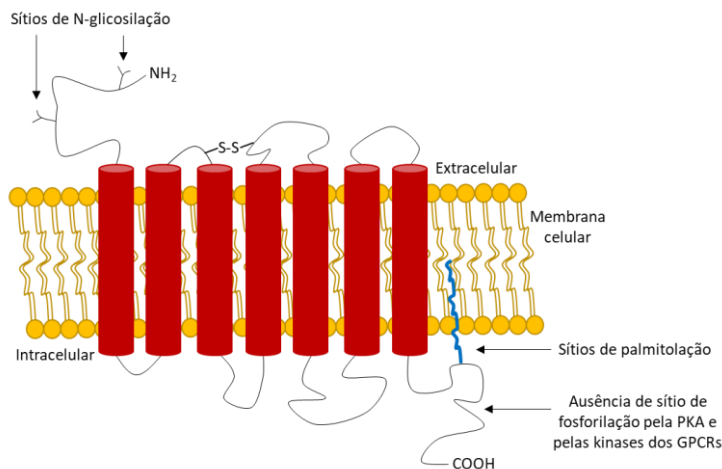


Figura 2. Estrutura do RA β 3^{172,177,178}.

A menor suscetibilidade à dessensibilização do RA β 3, contribuiu para o tornar um alvo terapêutico potencialmente adequado para tratamentos crônicos. Do ponto de vista molecular, a dessensibilização do RA β 3 pode não ser mediada por internalização/degradação do receptor, como para o RA β 1¹⁷⁹, mas sim por *downregulation* de componentes a jusante da via de sinalização¹⁸⁰ ou mesmo regulação do seu mRNA (ácido ribonucleico mensageiro)¹⁷⁷. No entanto, deve-se ter cautela ao avaliar os dados presentes na literatura científica, em relação a sua dessensibilização, pois, os resultados não foram sempre consistentes¹⁷⁷.

Os domínios transmembranares 3, 4, 5 e 6 são essenciais para ligação do ligante, enquanto o 2 e o 7 estão envolvidos na ativação da proteína Gs (G estimulatória).

Os critérios utilizados para definir uma resposta farmacológica característica do RA β 3 foram definidos em vários estudos¹⁸¹⁻¹⁸⁶ e olhando pela lente do ligante, o MBG, vibegron, solabegron e ritobegron são agonistas seletivos com alta afinidade e potência, enquanto, o CGP12177A, bucindolol e pindolol possuem atividade agonista parcial¹⁸¹⁻¹⁸⁶.

Estruturalmente, a maioria dos ligantes do RA β 3 compartilham uma estrutura molecular fundamental similar, com três domínios, sendo duas extremidades conectadas. Uma das extremidades é formada por uma estrutura de ariletanolamina ou ariloxipropanolamina¹⁸⁷, o ligante intermediário tem várias estruturas, incluindo

porções aromáticas e alifáticas, já a extremidade oposta normalmente contém funcionalidades polares e/ou ionizáveis¹⁸⁸. Um grande número de ligantes já foi testado, mas a atribuição a cada parte dos três domínios principais permanece controversa^{189,190}.

Os agonistas do RA β 3 dividem-se em duas classes, dependendo da época de sua descoberta¹⁸⁹: os de primeira geração, compostos como o BRL37344 e o CL316243, que foram desenvolvidos na década de 1990; e os de segunda geração que foram construídos ou melhorados a partir dos de primeira geração. A tabela 1 contém uma breve demonstração dos agonistas utilizados em estudos clínicos.

Desde sua descoberta no final da década de 1980, o RA β 3 foi detectado em vários tecidos humanos, como miocárdio, retina, miométrio, tecido adiposo, vesícula biliar, cérebro, bexiga urinária e vasos sanguíneos. Sua expressão foi registrada tanto a nível do mRNA, quanto de proteína, e sua ativação envolve uma variedade de vias celulares¹⁹¹. Os principais tecidos que expressam o RA β 3, bem como suas vias de sinalização associadas e possíveis implicações clínicas em humanos estão resumidos na tabela 2.

As abordagens terapêuticas descritas na tabela 2 são apenas algumas das maneiras pelas quais o RA β 3 já foi pensado. Mas, ainda estão em desenvolvimento e precisam ser explorados. Por exemplo, o mRNA bem como a proteína do RA β 3 foram relatados no sistema reprodutor feminino (ovários, placenta, e trompas de Falópio) em uma análise quantitativa abrangente do transcriptoma humano¹⁹². Estudos mecanísticos podem trazer mais informações sobre a funcionalidade do RA β 3 em tecidos que ainda não foram investigados.

Tabela 1. Agonistas do RA β 3 testados em estudos clínicos.

Composto	Fabricante	Indicação	Situação	Referência
Mirabegron (YM178)	Astellas Pharma	Síndrome da bexiga hiperativa	Aprovado pelo FDA	193
Amibegron (SR58611A)	Sanofi	Antidepressivo / ansiolítico	Fase II e III (descontinuado)*	194,195 Clinicaltrials.gov NCT00252330
Solabegron (GW427353)	GlaxoSmithKline	Síndrome da bexiga hiperativa	Fase II (em andamento)	196,197 Clinicaltrials.gov NCT03475706
Ritobegron (KUC-7483)	Kissei Pharmaceuticals Co.Ltd.	Síndrome da bexiga hiperativa	Fase III (descontinuado)*	196-199 Clinicaltrials.gov NCT01003405
Vibegron	Kyorin Pharmaceutical Co.,Ltd. / Kissei Pharmaceutical Co., Ltd.	Síndrome da bexiga hiperativa	Aprovado (Japão)	200,201

*Ausência de eficácia

Tabela 2. Tecidos que expressam o RA β 3, vias de sinalização e potencial terapêutico.

Região anatômica	Função	Mediadores	Potencial terapêutico	
Sistema urinário	Bexiga	Relaxamento	G _s (cAMP/PKA)	Tratamento para síndrome da bexiga hiperativa
	Rim	Reabsorção de água	G _s (cAMP/PKA)	-
Sistema nervoso central	Cérebro	Aumento de triptofano e 5-HT	-	Antidepressivos
	Retina	Crescimento e migração da célula endotelial	MAPK, MMP2/9 e PKG	-
Tecido adiposo	Lipólise e termogênese	G _s (cAMP/PKA) e G _i (NO)		Tratamento para obesidade ou diabetes
Miocárdio	Redução/aumento da contratilidade cardíaca	G _i (NO)/G _s (cAMP/PKA)		Tratamento para IC
Miométrio	Relaxamento	cAMP		Tratamento para trabalho de parto prematuro

1.9 Aspectos farmacológicos do MBG.

O MBG possui a nomenclatura química de 2-(2-Amino-1,3-thiazol-4-yl)-N-[4-(2-((2R)-2-hydroxy-2-phenylethyl)amino)ethyl]phenyl]acetamide, fórmula molecular de C₂₁H₂₄N₄O₂S e peso molecular de 396,51 g/Mol ²⁰².

O MBG recebeu aprovação pela FDA (Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA) para sua comercialização em abril de 2012. A fabricante Astellas Pharma US, Inc. o trouxe ao mercado com a indicação clínica para tratamento da SBH. A máxima dose indicada para humanos é de 50 mg/dia, sendo de 25mg/dia para pacientes com insuficiência renal ou disfunção hepática severa ²⁰².

Avanços na compreensão da fisiopatologia da bexiga hiperativa identificaram os três subtipos de RA β (1, 2 e 3) no músculo detrusor da bexiga e urotélio ^{203,204}. Na bexiga humana, 97% do mRNA total correspondem ao do RA β 3, e ele é considerado o principal subtipo mediador do relaxamento do músculo liso detrusor durante a fase de armazenamento ^{205,206}.

O MBG é um agonista seletivo do RA β 3. Ao estimular os RA β 3s na bexiga, o MBG induz o relaxamento e, portanto, aumento do armazenamento de urina, redução da contração e, conseqüentemente, menos micções indesejadas ²⁰⁷.

Em humanos, o MBG oral é prontamente absorvido, com concentrações plasmáticas máximas alcançadas no intervalo de 3 a 5 horas após a administração única ou múltipla de uma dose de 50 mg ²⁰⁸⁻²¹¹. Quando administrado uma vez ao dia, as concentrações plasmáticas do MBG atingem estado de equilíbrio em 7 dias e há acúmulo de duas a três vezes de sua concentração ^{208,209,211}. A absorção do MBG é reduzida quando o fármaco é ingerido após refeições ^{208,212}.

O MBG realiza ligação às proteínas plasmáticas no intervalo de 71% a 77% e é metabolizado por vias como, a hidrólise de amida, glucuronidação, N-desalquilação e oxidação ²¹³ e enzimas tais como, butirilcolinesterase, UDP-glucuronosiltransferases ²¹⁴, e possivelmente álcool desidrogenase ²¹⁵.

O MBG é eliminado prevalentemente na urina (\cong 55%), mas, também nas fezes (\cong 34%), e parte dele pode ser reabsorvida ²¹³. O MBG tem uma meia-vida de eliminação de aproximadamente 50 horas, uma depuração corporal total no plasma de aproximadamente 57 L/h e uma depuração renal de aproximadamente 13 L/h, essa última ocorrendo via secreção tubular ativa (predominantemente) e filtração glomerular ²¹³.

Em cinco estudos de curto prazo, o MBG melhorou a frequência de micção e a incontinência em geral em adultos com SBH. Após 12 semanas de tratamento, o número diário de episódios de micção (desfecho primário em todos os estudos) foi significativamente reduzido com MBG em relação ao placebo ^{216–220}, assim como o número diário de episódios de incontinência na maioria dos estudos ^{216,217,219,220}.

1.10 Segurança cardiovascular do MBG e em condições de obesidade.

Muitos pacientes com SBH têm múltiplas comorbidades, como hipertensão, diabetes e IC ^{221–223}. Nesse contexto, a segurança cardiovascular da farmacoterapia para SBH é importante.

Apesar de 97% do mRNA total dos RAβs corresponderem ao RAβ3, na bexiga humana ^{205,206}, todos os três subtipos dos RAβs são expressos no sistema cardiovascular, despertando a atenção sobre os efeitos cardiovasculares dos agonistas dos RAβs ²²⁴.

Os efeitos mediados pelo RAβ1 aumentam a frequência cardíaca e a força de contração; agonistas com atividade e seletividade relativamente limitada ao RAβ3 desencadeia efeitos inotrópicos positivos no tecido atrial humano e efeitos inotrópicos negativos no tecido ventricular ²²⁴. Além disso, os RAβ2s estão localizados no músculo liso vascular, mediando a vasodilatação ²²⁵.

O MBG *in vitro*, possui afinidade substancialmente maior (150 e 33 vezes) para RAβ3 do que para o RAβ1 e o RAβ2, respectivamente ²²⁶.

Na população de pacientes com SBH que recebeu o MBG por 12 semanas, na dose diária de 50 mg, houve pequenos aumentos na pressão arterial e taxa de pulso, versus o placebo, aproximadamente 1 mmHg e 1 bpm, respectivamente, que foram reversíveis com a descontinuação do tratamento. Não houve aumento nas taxas de hipertensão associados ao tratamento, versus placebo ²²⁷, e uma baixa proporção (<5%) de pacientes apresentou evento adverso de taquicardia. Resultados semelhantes foram observados com MBG na dose de 25 mg ²²⁷. No que diz respeito a segurança do uso do MBG em condições de obesidade ou síndrome metabólica, Finlin B. e colaboradores realizaram estudos que investigam parâmetros metabólicos e cardiovasculares em indivíduos obesos (IMC >27) e com diabetes, que receberam MBG por 12 semanas na dose diária de 50 mg ²²⁸. Este estudo demonstra a segurança do MBG em pacientes com

obesidade associada ao diabetes, apresentando inclusive, melhora de parâmetros relacionados a termogênese e metabolismo da glicose, bem como uma diversidade de resultados no que se diz respeito a parâmetros metabólicos ²²⁸.

Estudos rigorosos demonstraram que o uso do MBG é seguro em relação ao funcionamento cardiovascular ²²⁹ e em condições de obesidade ²²⁸, desde que seja feito um acompanhamento terapêutico. Essas informações aumentam a gama de interesses do uso desse agonista seletivo do RA β 3 em condições que diferem da sua indicação clínica primária, tornando-o uma ferramenta para reposicionamento em condições de interesse, com atenção ao risco e benefício.

Nesse sentido, o MBG despertou interesse aos estudos que visam encontrar alternativas terapêuticas em outras condições clínicas. Existem alguns estudos clínicos sendo realizados com o MBG para condições como hipertensão pulmonar, IC, e disfunção erétil associada à hiperplasia prostática, como pode ser conferido na tabela 3.

Tabela 3. Mirabegron em estudos clínicos.

Composto	Responsável	Indicação	Situação	Referência
Mirabegron	Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III	Hipertensão pulmonar e IC	Fase II	230
Mirabegron	Henning Bundgaard, Rigshospitalet, Denmark	IC	Fase III	231
Mirabegron	Jean-Luc Balligand, Université Catholique de Louvain	Hipertrofia ventricular esquerda	Fase II	232
Mirabegron	Mansoura University	Disfunção erétil associada à DTUI	Fase II	233
Mirabegron	Johns Hopkins University	Disfunção erétil associada à SBH	Fase II	234
Mirabegron/ Tamusolin	Anil Kapoor, St. Joseph's Healthcare Hamilton	SBH associada à hiperplasia prostática benigna	Fase IV	235

1.11 Justificativa.

O IMC elevado é um fator de risco para a saúde, e está relacionado a diminuição do tempo de vida vivido com saúde, tanto em mulheres como em homens, considerando todas as faixas etárias ¹.

Alterações funcionais e estruturais do tecido adiposo, podem ser associadas com maior volume sanguíneo, aumento do débito cardíaco e redução da resistência vascular sistêmica ⁸⁷. Configurando uma importante influência do tecido adiposo na homeostase cardiovascular. Em condições de obesidade, portanto, o risco cardiovascular é proeminente ^{11,12}.

O PVAT que está localizado ao redor da artéria aorta, das artérias coronárias, dos vasos de resistência e da vasculatura do sistema musculoesquelético ⁵³⁻⁵⁵, exerce um efeito hipocontrátil na vasculatura adjacente, em condições de saúde ⁵⁹. O RAβ3 exerce importante contribuição para a função hipocontrátil do PVAT quanto estimulado pela NOR ⁷³.

Durante a obesidade em humanos ^{109,145} e em camundongos ¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ o PVAT perde seu efeito hipocontrátil. A disfunção cardiovascular presente em condições de obesidade não é rastreável a nível de origem, pois, o indivíduo obeso geralmente apresenta mais de um fator disfuncional em seu organismo, principalmente na função metabólica ¹⁰⁸.

Algumas abordagens são sugeridas para melhora do efeito hipocontrátil do PVAT em condições que ele se encontra disfuncional. A abordagem farmacológica é um exemplo ¹⁵². No entanto, ainda não há uma terapia eficaz, para prevenção da disfunção ou restabelecimento da função do PVAT em condições de obesidade.

O MBG demonstrou ser um medicamento seguro quando se refere a função cardiovascular ¹⁵² e condições de obesidade ²²⁸. Esses estudos fornecem subsídios para o seu estudo em condições que seu mecanismo de ação pode contribuir para uma melhora da condição de saúde.

1.12 Hipótese.

O tratamento com MBG contribui para a manutenção do efeito hipocontrátil do PVAT aórtico torácico durante a obesidade, via aumento da síntese da eNOS.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral.

Determinar se o tratamento com MBG contribui para a manutenção do efeito hipocontrátil do PVAT aórtico torácico durante a obesidade experimental, via aumento da síntese da eNOS.

2.2 Objetivos específicos.

2.2.1 Determinar se a obesidade induz prejuízo do efeito hipocontrátil do PVAT.

Camundongos controles e obesos foram utilizados para:

- a) determinação da resposta contrátil de secções arteriais aórticas à NOR;
- b) determinação do conteúdo proteico da eNOS no PVAT.

2.2.2 Determinar se o tratamento com MBG modula a via do NO no PVAT.

Camundongos controles e obesos, tratados com MBG ou VEI foram submetidos ao protocolo a do item 2.2.1 e:

- b) avaliação da resposta contrátil de secções arteriais aórticas à NOR, na presença do inibidor não seletivo das sintases do óxido nítrico: o L-NAME;
- c) determinação do conteúdo proteico da eNOS no PVAT.

2.2.3 Determinar se o tratamento com MBG contribui para a manutenção do efeito hipocontrátil do PVAT e se o RA β 3 participa nesse contexto. Camundongos controles e obesos tratados com MBG ou veículo foram submetidos ao protocolo a do item 2.2.1

e:

- b) avaliação da resposta contrátil de secções arteriais aórticas à NOR, na presença do antagonista do RA β 3: o SR5923OA.
- c) determinação do conteúdo proteico do RA β 3 no PVAT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados no estudo.

Camundongos da linhagem C57Bl6 machos, foram adquiridos do Biotério Central da Universidade de São Paulo *Campus* de Ribeirão Preto com 35 dias de vida. Os camundongos foram alojados em grupos de 5 animais em mini-isoladores com dimensões de 207 mm de altura, 215 mm de largura, 316 mm de comprimento e 451 cm² de área de piso e forrados com maravalha.

Os mini-isoladores foram acondicionados em rack com sistema de ventilação intracaixa, com troca de ar por insuflação e exaustão. O monitoramento dos camundongos e a limpeza em 2 dias por semana dos mini-isoladores, foram realizados no espaço de manutenção para camundongos do departamento de farmacologia da FMRP USP. O espaço provê de ciclo claro e escuro com intervalo de 12 horas e temperatura de aproximadamente 24°C.

A dieta oferecida aos camundongos foi composta de água potável filtrada e ração padrão (3,4 kcal/g) ou ração hipercalórica (9,6 kcal/g, PragSoluções, Brasil) disponíveis *ad libitum*. Todo o protocolo experimental deste estudo foi realizado seguindo as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A aprovação ocorreu em 27 de maio de 2020 sob número de inscrição 82/2020.

3.2 Dieta dos camundongos e administração do MBG.

Os camundongos com 35 dias de vida receberam dieta padrão por 7 dias para aclimatação no espaço de manutenção. A partir do oitavo dia de estadia no biotério, uma parte dos animais recebeu dieta hipercalórica (DH; Quadro 1), doravante grupo obeso (OB) enquanto a outra parte dos animais continuou com o consumo da dieta padrão (DP), denominado grupo controle (CT). O protocolo para indução da obesidade durou 18 semanas, a contar da 6ª semana de vida dos camundongos.

Aproximadamente 20% dos animais expostos a dieta hipercalórica não adquirem características de obesidade. Foi determinada a massa corporal mínima de 38 gramas aferida no início da 14ª semana de dieta para serem utilizados no estudo, pois, a partir dessa massa corporal, os animais apresentavam índice de Lee > 0,35,

caracterizando a obesidade. A administração de 10 mg/kg²³⁶ de MBG [MYRBETRIQ™ (diluído em água potável filtrada)] ou veículo [VEI; água potável filtrada (mesmo volume)] ao dia foi realizada via gavagem do início da 14ª semana de dieta até o fim da 18ª semana de dieta, totalizando 30 dias de tratamento.

Quadro 1. Componentes da ração hipercalórica (9,6 kcal/g).

Componente	Quantidade (%)
Amido de milho	0,00
Caseína	20,85
L-cistina	0,39
Amido dextrinizado	5,15
Sacarose	7,90
Óleo de soja	3,23
Banha	50,66
Celulose microcristalina	5,46
Mix mineral PSB100026	1,29
Mix mineral AIN 93 M	0,00
Fosfato de cálcio dibase	1,68
Carbonato de cálcio	0,71
Citrato de potássio	1,13
Mix vitamina AIN 93	1,29
Bitartarato de colina	0,26

A ração foi obtida da empresa PragSoluções Biociências. Domeneghetti e Corrêa LTDA. Jau - SP. A ração foi armazenada em freezer à - 20°C. No momento da oferta aos animais, a ração permanecia fora do freezer, para adquirir temperatura ambiente, para então, ser adicionada à gaiola.

3.3 Determinação da massa corporal dos camundongos e da quantidade de ração consumida.

A massa corporal individual e a quantidade de ração consumida em cada mini-isolador foram avaliadas no sétimo dia de cada semana da dieta pela utilização de uma balança eletrônica semianalítica. A ingestão calórica para cada mini-isolador foi inferida pela equação: *ração consumida (g) x valor energético (kcal/g)*.

3.4 Eutanásia, obtenção de sangue e de tecidos dos camundongos.

Ao final da 18ª semana de dieta os camundongos foram eutanasiados pelo método de sobredosagem de anestésico utilizando-se da mistura de cloridato de cetamina e xilazina (270/30 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a confirmação da eutanásia, os animais foram submetidos à abertura da cavidade torácica. Quando o objetivo foi a remoção de sangue, com auxílio de uma seringa (1 ml) e agulha (21 G) puncionou-se o coração. Quando o objetivo foi a remoção da artéria aorta torácica, o

coração e os lóbulos pulmonares foram removidos para melhor visualização da artéria, seguida de sua remoção. Em determinados casos, foram identificados e removidos o TAM interescapular e os tecidos adiposos brancos retroperitoneal, epididimal e inguinal.

3.5 Determinação do índice de Lee e do peso de tecidos adiposos dos camundongos.

A determinação do índice Lee foi feita ao final da 18ª semana de dieta dos camundongos pela equação: $\frac{\text{massa corporal (g)} \times 0,33}{\text{comprimento naso anal (cm)}}$. Os tecidos adiposos foram removidos pelo mesmo pesquisador e foram pesados individualmente em balança analítica, os valores determinados são referentes ao peso úmido.

3.6 Obtenção do soro.

Após a punção cardíaca o sangue permaneceu por 30 minutos em temperatura ambiente e foi submetido à centrifugação por 5 minutos à 5000 rpm em temperatura ambiente, então, o soro foi coletado e armazenado à - 80°C.

3.7 Determinação sérica da atividade das enzimas AST e ALT e da concentração de colesterol total, HDL e LDL.

A determinação da atividade da AST (aspartato aminotransferase) e da ALT (alanina aminotransferase) foi realizada 1 semana após a coleta do soro por método cinético contínuo de 2 pontos em ultravioleta (37°C) padronizado pela IFCC (Federação Internacional de Química Clínica e Medicina laboratorial). A determinação da concentração de colesterol total e frações HDL (lipoproteína de alta densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) foi realizada 2 semanas após a coleta do soro por método enzimático colorimétrico. Para esses protocolos os camundongos foram submetidos à privação alimentar durante 6 horas (das 8:00 às 14:00 horas) antes da coleta do sangue.

Essas determinações foram realizadas de acordo com o proposto em sistemas de detecção padronizados. Os sistemas utilizados se encontram no quadro 2.

Quadro 2. Sistemas de detecção para determinações de analitos em soro.

Analito	Sistema de detecção
Atividade da AST	AST/GOT Liquiform Labtest (Ref. 109)
Atividade da ALT	ALT/GPT Liquiform Labtest (Ref. 1008)
Colesterol total	Colesterol Liquiform Labtest (Ref. 76)
Colesterol HDL	HDL liquiform Labtest (Ref. 13)
Colesterol LDL	LDL liquiform Labtest (Ref. 111)

3.8 Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).

Ao final da 18ª semana de dieta, os camundongos foram submetidos à privação alimentar durante 6 horas (das 8:00 às 14:00 horas), a glicemia em gota de sangue extraída da cauda de cada animal foi verificada por glicosímetro portátil (Accu-Check Active, Roche Alemanha), caracterizando a glicemia no tempo zero. Em seguida, a glicose na dose de 2 g/kg foi administrada aos camundongos por gavagem. Então foi determinada a glicemia nos tempos de 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose conforme indicado no método proposto pelo *National Mouse Metabolic Phenotyping Center*²³⁷.

3.9 Estudo da resposta contrátil de secções da artéria aorta torácica à NOR.

A artéria aorta torácica com PVAT preservado foi removida de cada camundongo e acondicionada em solução de Krebs Henseleit modificada (Krebs) composta por: 130 mM de NaCl; 14,9 mM de NaHCO₃; 4,7 mM de KCl; 1,18 mM de KH₂PO₄; 1,17 mM de MgSO₄·7H₂O; 5,5 mM de glicose; 1,56 mM de CaCl₂·2H₂O e 0,026 mM de EDTA.

A artéria aorta torácica isolada foi segmentada transversalmente com auxílio de uma tesoura de dissecação de 8 centímetros e uma pinça. Então, uma haste metálica foi inserida longitudinalmente no interior luminal do segmento impulsionando atrito contra a parede interna do segmento com o intuito de se remover o endotélio. A aorta de cada animal foi subdividida em 2 secções de 2 mm de comprimento, uma secção provida de PVAT (região mais próxima ao arco aórtico) e a outra desprovida de PVAT (região mais distante do arco aórtico).

As secções aórticas foram montadas em 2 pinos paralelos (0,2 mm) da câmara de órgãos do sistema de miografia de 4 canais, previamente calibrados para reconhecimento da unidade de força em Milinewton [mN (Multi-Channel Myograph

System 620M. Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark)]. As secções permaneceram imersas em Krebs com temperatura de 37°C e continuamente aerada com mistura gasosa de O₂ e CO₂ (95% e 5%). Para se determinar a força inicial de zero, os 2 pinos foram ajustados com o máximo de proximidade um do outro sem causar registro de força. O protocolo foi dividido em 4 etapas:

- 1ª. estabilização da força passiva basal de 5 mN nas secções;
- 2ª. registro da resposta contrátil à adição da solução de Krebs KCl 90 mM, composta por: 44,7 mM de NaCl; 14,9 mM de NaHCO₃; 90 mM de KCl; 1,18 mM de KH₂PO₄; 1,17 mM de MgSO₄·7H₂O; 5,5 mM de glicose; 1,56 mM de CaCl₂·2H₂O e 0,026 mM de EDTA.
- 3ª. registro da resposta à 10 µM de acetilcolina em secções com platô de resposta contrátil à 100 nM de fenilefrina;
- 4ª. registro da resposta à adição cumulativa (100 pM a 10 µM) de NOR (diluída em água com 0,1 mM de ácido ascórbico).

A taxa porcentual do efeito relaxante promovido por acetilcolina foi determinada pela equação: $\frac{\Delta \text{resposta à acetilcolina (mN)}}{\Delta \text{resposta à fenilefrina (mN)}} \times 100$. Determinou-se remoção de endotélio eficaz, quando esse porcentual esteve menor de 20%.

Em algumas secções aórticas antes de se realizar a 4ª etapa as secções foram expostas durante 30 minutos ao L-NAME (N^ω-nitro-L-arginina metil éster; 100 µM; inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase) ou ao SR59230A (1 nM; antagonista seletivo do RAβ₃; pA₂ = 8,3)²³⁸.

3.10 Protocolo de western blot.

3.10.1 Extração de proteínas totais do PVAT.

Depois de isolado o PVAT permaneceu em freezer à - 80°C até a realização do protocolo. O PVAT foi colocado em placa de vidro sobre o gelo e com o auxílio de uma tesoura de dissecação de 8 centímetros e uma pinça foi feita a sua segmentação para melhor solubilização no tampão de extração.

Para cada 50 mg de PVAT foi utilizado 200 µl do tampão de extração. O tampão de extração foi composto por 500 mM de NaCl, 50 mM de Tris (pH 7,4), 1% de IGEPAL,

5% de glicerol e coquetel inibidor de proteases SIGMAFAST™ (adaptado do método proposto por Park M. e colaboradores, 2019) ²³⁹.

Os tubos com PVAT imersos no tampão de extração foram mantidos no gelo por 2 horas e em intervalos de 15 minutos foram homogeneizados em vórtex por 5 segundos. Os tubos foram então centrifugados à 5.000 rpm por 10 minutos em equipamento refrigerado à 4°C. O sobrenadante dos tubos foi então removido e transferido para um segundo tubo, evitando-se a pipetagem do precipitado ou da camada lipídica formada na superfície. Esse segundo tubo foi centrifugado à 5.000 rpm por 5 minutos à 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação proteica total.

3.10.2 Extração de proteínas totais da artéria aorta torácica.

Depois de isolado, todo o segmento aórtico da região torácica desprovido de PVAT permaneceu em freezer à -80°C até a realização do protocolo. O segmento aórtico ultracongelado foi pulverizado por compressão física para melhor solubilização no tampão de extração.

Foi utilizado a proporção de 50 µl do tampão de extração para cada segmento aórtico individual. O tampão de extração foi composto por 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris (pH 7,4), 1 % de IGEPAL, 0,5 % de desoxicolato de sódio 150 µM de PMSF e coquetel inibidor de proteases SIGMAFAST™.

Os tubos foram mantidos no gelo por 3 horas e em intervalos de 15 minutos foram homogeneizados em vórtex por 5 segundos. Os tubos foram então centrifugados à 5.000 rpm por 10 minutos em equipamento refrigerado à 4°C. O sobrenadante dos tubos foi utilizado para a quantificação proteica total.

3.10.3 Quantificação de proteínas totais

Tanto para o sobrenadante do PVAT quanto para o da aorta o ensaio do ácido bicinconínico (BCA, Abcam, ab102536) foi utilizado para determinação da absorbância das amostras. Um espectrofotômetro configurado ao comprimento de onda de luz visível de 562 nm foi utilizado. Foi registrado a absorbância de uma curva analítica de 0,5 a 30 µg de albumina sérica bovina para plotar a equação da reta reduzida [$y = mx + n$] onde, x e y são, respectivamente, a variável independente e a variável dependente; m é o coeficiente angular, e n é o coeficiente linear.

3.10.4 Eletroforese e transferência de proteínas.

Após obter o volume com a quantidade de proteínas requeridas, 80 µg para o PVAT e 50 µg para a aorta, o tampão de amostra (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad 1610737) acrescido de 20% β-mercaptoetanol foi adicionado em uma proporção de 33,3% do volume da amostra proteica. As amostras foram aquecidas à 75°C por 10 minutos e aplicadas na malha de poliacrilamida para eletroforese à temperatura ambiente.

A transferência de proteínas foi realizada em um sistema de tanque úmido em geladeira, e membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 µm foram utilizadas. Para o protocolo utilizou-se do sistema de western blot da Bio-Rad Laboratories. O protocolo foi ajustado de acordo com o alvo proteico como pode ser verificado no quadro 3.

Quadro 3. Protocolo de western blot de acordo com alvo proteico.

Alvo proteico	eNOS _f ^{ser1177} /eNOS _t	RAβ (1, 2 e 3)	UCP1	GCα/GCβ
Fonte proteica	PVAT	PVAT	PVAT	aorta
Malha de poliacrilamida	1,5 mm/6%	1,5 mm/10%	1,5 mm/10%	1,5 mm/10%
Quantidade de proteína por coluna	80 µg	80 µg	80 µg	50 µg
Eletroforese	90 V/2 h 00 min	90 V/2 h 30 min	90 V/2 h 30 min	90 V/2 h 30 min
Transferência	90 V/3 h 30 min	90 V/1 h 30 min	90 V/1 h 30 min	90 V/1 h 30 min
Bloqueio de epítomos	BSA 5%/2 h	BSA 3%/2 h	BSA 3%/2 h	BSA 2%/2 h
PMP	Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder. Thermo Sci. 26634			

PMP (peso molecular padrão).

O anticorpo primário foi adicionado à membrana que permaneceu em movimento de gangorra por aproximadamente 14 horas em geladeira. Posteriormente, o anticorpo secundário foi adicionado à membrana que permaneceu em movimento de gangorra durante 1 hora à temperatura ambiente.

As membranas foram expostas à um substrato quimioluminescente (ECL plus - Amersham Biosciences do Brasil LTDA) e a aquisição das imagens se deu pelo sistema de captura ImageQuant™ LAS 4000, por meio de uma câmera com sensor conversor de sinal luminoso em carga elétrica, fornecendo os dados em pixels. Em necessidade de realizar o deblote, as membranas permaneceram em agitação suave por 20 minutos à 37 °C, imersas na solução de deblote Restore™ Western Blot Stripping Buffer (ThermoFisher Scientific 21063) e em seguida foram lavadas e submetidas a um novo

bloqueio de epítomos. Para quantificação da eNOS_f^{ser1177} e da eNOS_t, a mesma membrana foi utilizada, realizando o deblote entre uma quantificação e outra. Os anticorpos utilizados podem ser conferidos no quadro 4

Quadro 4. Anticorpos utilizados na técnica de western blot.

Alvo	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
eNOS _f ^{ser1177}	1:1000/Cell Sig. 95715	1:5000/Sigma Ald. R2004
eNOS _t	1:1000/Abcam 76198	1:3000/EMD Millipore 12-349
RAβ1	1:1000/Enzo ADI905784100	1:5000/Sigma Ald. R2004
RAβ2	1:1000/Enzo ADI905742100	1:5000/Sigma Ald. R2004
RAβ3	1:1000/Abcam 94506	1:5000/Sigma Ald. R2004
UCP1	1:1000/Abcam 23841	1:5000/Sigma Ald. R2004
GCα	1:1000/Abcam 50358	1:5000/Sigma Ald. R2004
GCβ	1:1000/Sigma Ald.4501344	1:5000/Sigma Ald. R2004

3.11 Determinação da concentração sérica de nitrito.

A determinação da concentração sérica de nitrito foi feita após 48 horas da coleta do soro que permaneceu em freezer à -80°C. Foi utilizado um sistema de determinação de nitrito (Griess Reagent Kit for Nitrite Determination. ThermoFisher Scientific G-7921) por meio de procedimentos espectrofotométricos baseados na reação de Griess.

Neste protocolo o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)-di-hidrocloreto de etilenodiamina, gerando um composto de coloração vermelha. A absorbância foi determinada sob o comprimento de onda de luz em 548 nm. Uma curva analítica de nitrito foi utilizada como referência de absorbância e a equação da reta reduzida [$y = mx + n$] onde, x e y são, respectivamente, a variável independente e a variável dependente; m é o coeficiente angular, e n é o coeficiente linear; foi utilizada para se obter a quantidade de nitrito da amostra. O conteúdo de nitrato das amostras de soro não foram previamente convertidas em nitrito por redução enzimática, por isso, o teste reflete somente o conteúdo de nitrito.

3.12 Determinação da fluorescência de DHE no PVAT.

Os segmentos aórticos com PVAT preservado foram embebidos em meio de inclusão para amostras frescas (Tissue Tek Compound). Em seguida, foram congelados e estocados à -80°C. Os segmentos foram seccionados transversalmente em 5 µm em

um criostato à -15°C (Cryostat Leica, Nussloc, Alemanha) e fixados em lâmina para microscopia.

Para análise da geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) as secções foram lavadas com solução salina tamponada e expostas à $5\ \mu\text{M}$ de DHE (dihidroetidina) durante 30 minutos, à 37°C em câmara escura úmida. Após o período de incubação, os cortes foram novamente lavados com solução salina tamponada e expostos ao meio de montagem Fluoroshield™ com DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol). Os cortes foram cobertos com uma lamínula e imediatamente submetidos à análise em um microscópio de fluorescência. A fluorescência DHE foi registrada sob incidência de luz com comprimento de onda de 480 a 530 nm evidenciando oxidação por superóxido e/ou peróxido de hidrogênio. A fluorescência do DAPI foi registrada sob incidência de luz com comprimento de onda de 405 nm refletindo a sua ligação às regiões do DNA (ácido desoxirribonucleico) celular ricos em timina e adenina. As sondas emitem fluorescência vermelha e azul, respectivamente.

O registro para quantificação foi feito por meio de um microscópio de fluorescência Olympus BX50, em uma ampliação da imagem de 12,6 vezes. Todo o registro de imagens foi feito pelo mesmo experimentador no mesmo dia da incubação com a sonda DHE. A intensidade de fluorescência foi analisada padronizando-se o mesmo número de células de cada segmento e corrigida pela dimensão da área observada. Para quantificação da fluorescência foi utilizado o software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

3.13 Representação gráfica dos resultados.

As representações gráficas foram plotadas com as coordenadas X e Y sendo compostas respectivamente por variável independente e dependente. Valores individuais, de média aritmética, do EPM (erro padrão da média) e número amostral foram utilizados. Os tipos de gráficos foram de linha de conexão com pontos sobrepostos; dispersão com valores individuais e barras intercaladas.

No estudo de resposta contrátil o valor da diferença de resposta de cada secção aórtica em relação a força basal (mN), foi calculado como taxa porcentual de resposta, corrigida pelo efeito contrátil induzido por Krebs KCl 90 mM

$\frac{\Delta \text{ resposta à Nor (mN)}}{\Delta \text{ resposta ao KCl 90 mM (mN)}} \times 100$. Esses dados foram submetidos a análise de regressão não-linear com uso de equação logística em curva concentração-resposta sigmoidal.

O valor de resposta máxima contrátil ($R_{\text{máx}}$) e o valor do logaritmo negativo da concentração molar que produz 50% de resposta máxima (pEC_{50}) foram obtidos. As representações gráficas foram realizadas pelo programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Prism 8.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.14 Análise estatística.

A comparação estatística foi realizada entre os valores da média aritmética \pm EPM. Foi utilizado o teste de análise de variância de 2 fatores com o teste de comparações múltiplas de *Sidak* ou Teste t de *Student*. A probabilidade de significância foi determinada quando o valor de p foi menor que 0,05. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Prism 8.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da massa corporal, do índice de Lee, do consumo de ração e da ingestão calórica.

A DH aumentou a massa corporal a partir da 12ª semana de dieta (Figura 3.a), elevou o índice de Lee (Figura 3.b), diminuiu da quantidade de ração consumida (Figura 3.c) e promoveu maior ingestão calórica (Figura 3.d) nos camundongos, comparado ao grupo que recebeu DP. O tratamento com MBG, aumentou o consumo de ração e ingestão calórica nos camundongos controles (Figura 3.c e d).

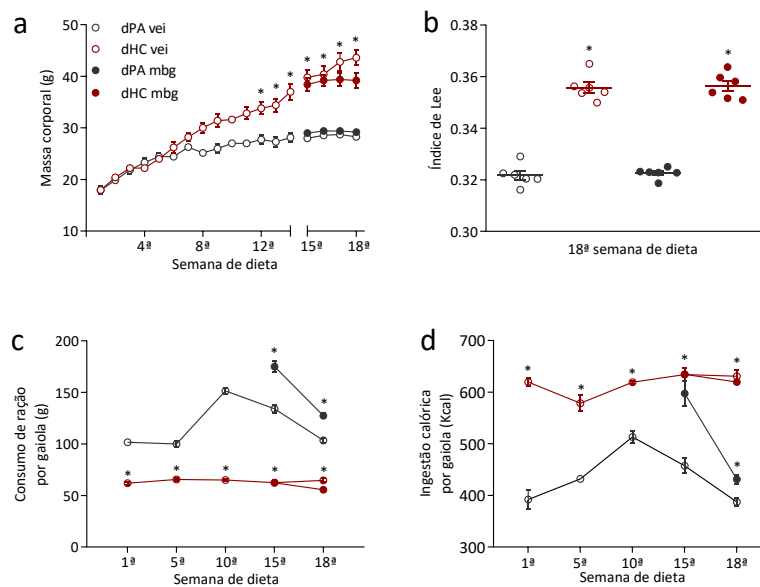


Figura 3. Massa corporal (a), índice de Lee (b), consumo de ração (c) e ingestão calórica (d). Resultados apresentados como média \pm EPM. $n = 4 - 6$. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores com teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * $p < 0,05$ vs. o valor respectivo à mesma semana do grupo controle VEI.

4.2 Determinação da massa corporal e do peso úmido de determinados tecidos gordurosos.

A obesidade aumentou o ganho de massa corporal, elevou o peso dos TABs retroperitoneal, epididimal e inguinal, bem como, do TAM interescapular nos camundongos, comparado ao grupo controle. O tratamento com MBG diminuiu o peso do TAB retroperitoneal nos camundongos obesos (Quadro 5).

Quadro 5. Massa corporal e peso dos tecidos adiposos.

Parâmetro	DP		DH		n
	VEI	MBG	VEI	MBG	
Massa corporal inicial (g)	18,75 ± 0,82	19,50 ± 1,11	17,93 ± 0,06	18,04 ± 1,08	
Massa corporal final (g)	27,75 ± 0,43	29 ± 1,0	43,5 ± 3,35 *	39,25 ± 2,27 *	
Ganho de massa corporal total (g)	11,38 ± 1,24	12,382 ± 0,25	29,15 ± 3,12 *	23,61 ± 4,58 *	
TAM interescapular (mg/g mc)	2,95 ± 0,17	2,97 ± 0,24	4,20 ± 0,36 *	4,22 ± 0,31 *	6
TAB retroperitoneal (mg/g mc)	3,90 ± 0,68	2,60 ± 0,14	19,71 ± 0,69 *	12,81 ± 0,78 *#	
TAB epididimal (mg/g mc)	11,97 ± 1,39	8,57 ± 1,10	44,33 ± 2,62 *	48,29 ± 2,15 *	
TAB inguinal (mg/g mc)	3,12 ± 0,21	2,87 ± 0,32	3,59 ± 0,28	4,05 ± 0,34	
mc, massa corporal. Para interpretação dos resultados de massa corporal considerar que a administração do MBG e do VEI foi iniciada na 14ª semana de dieta.					

Quadro 5. Massa corporal e peso úmido dos tecidos adiposos. Valores apresentados como média ± EPM. O ganho de massa corporal foi obtido pela análise temporal preservando os mesmos camundongos de cada grupo experimental. O peso úmido dos tecidos foi analisado logo após a eutanásia dos camundongos na 18ª semana de dieta. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores com teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * p < 0,05 vs. CT VEI. # p < 0,05 vs. OB VEI.

4.3 Determinação sérica da atividade das enzimas AST e ALT e da concentração de colesterol total, HDL e LDL.

A obesidade aumentou a atividade das enzimas AST (Figura 4.a) e ALT (Figura 4.b), e elevou a concentração sérica do colesterol total, da HDL e da LDL nos camundongos, comparado ao grupo controle (Figura 4.c - e). O tratamento com MBG diminuiu a concentração sérica da LDL nos camundongos obesos (Figura 4.e).

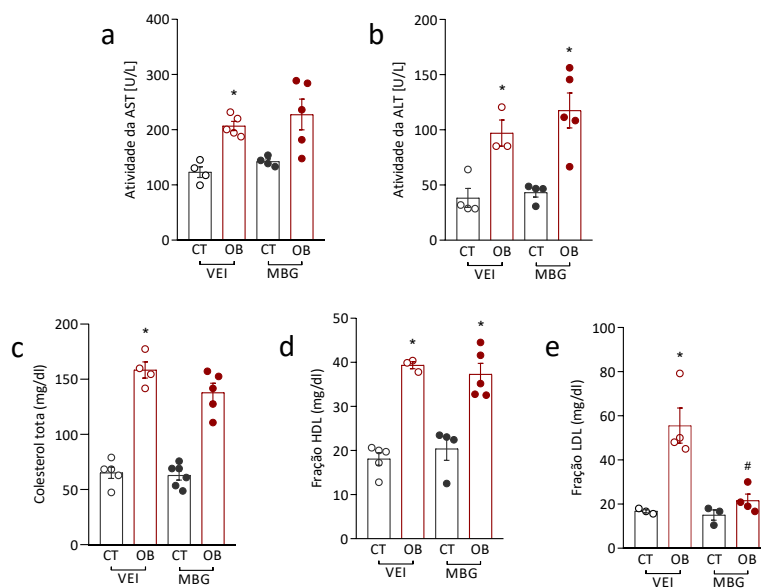


Figura 4. Atividade da AST e da ALT e concentração sérica de colesterol total, HDL e LDL. Cada barra representa a média \pm EPM. $n = 4 - 6$. (a e b) atividade (U/L) da AST e da ALT mensurada no soro. (c - e) concentração sérica (mg/dL) de colesterol total, HDL e LDL. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de Sidak. * $p < 0,05$ vs. grupo controle VEI. # $p < 0,05$ vs. grupo obeso VEI.

4.4 Determinação da glicemia após a privação alimentar e do TOTG.

A obesidade aumentou a glicemia aferida após a privação alimentar dos camundongos. O tratamento com MBG diminuiu esse parâmetro nos camundongos obesos e controles (Figura 5.a). A obesidade aumentou a glicemia em todos os tempos de análise do TOTG dos camundongos, enquanto, o tratamento com MBG diminuiu esse parâmetro nos camundongos (Figura 5.b e c).

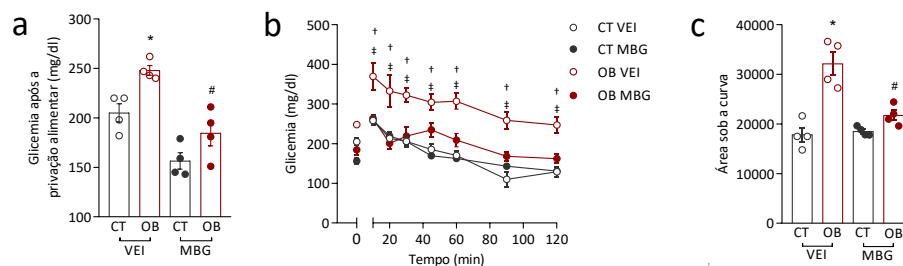


Figura 5. Glicemia após a privação alimentar e do TOTG. Resultados apresentados como média \pm EPM. $n = 4 - 5$. (a) glicemia aferida no tempo 0 do TOTG. (b) glicemia (mg/dl) aferida antes (tempo 0) e após (tempos de 10, 20, 30, 40, 60, 90 e 120 min) a administração de 2 g/kg de glicose via gavagem. (c) área sob a curva obtida com os valores do item b. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores com teste de comparações múltiplas de Sidak. * $p < 0,05$ vs. grupo controle VEI. # $p < 0,05$ vs. grupo obeso VEI. † $p < 0,05$ vs. o respectivo tempo do grupo controle VEI. ‡ $p < 0,05$ vs. o respectivo tempo do grupo obeso VEI.

4.5 Determinação da resposta contrátil de secções aórticas à adição cumulativa de NOR.

4.5.1 Efeito do PVAT e da dieta.

O efeito hipocontrátil do PVAT, foi observado nos camundongos controles (Figura 6.a), enquanto, a obesidade prejudicou esse parâmetro (Figura 6.b) e foi responsável pelo aumento da resposta contrátil de secções sem PVAT comparado aos camundongos controles (Figura 6.c).

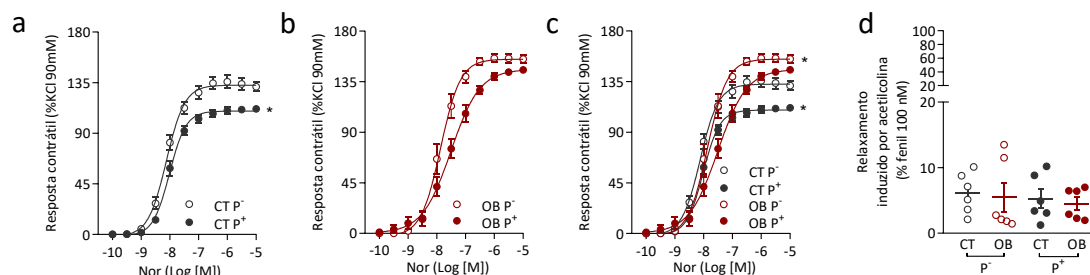


Figura 6. Efeito do PVAT e da dieta na resposta contrátil à NOR. Representação gráfica sigmoide com a taxa percentual da resposta contrátil à adição cumulativa de NOR (100pM a 10μM) corrigida pelo efeito contrátil induzido pela solução de Krebs KCl 90 mM. (a) estudo do efeito do PVAT. (b) estudo do efeito do PVAT associado à dieta. (c) compilado dos dados dos itens a e b. (d) taxa percentual do efeito relaxante promovido por 10 μM de acetilcolina em relação ao efeito contrátil induzido por 100 nM de fenilefrina nas secções utilizadas nessa análise. Os valores da média ± EPM da $R_{m\acute{a}x}$ de cada curva sigmoide foram utilizados para a comparação estatística por teste t de *student* ou análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. n = 6. * p < 0,05 vs. grupo controle sem PVAT. Os valores do pEC₅₀ podem ser conferidos no quadro 6.

4.5.2 Efeito do tratamento com MBG.

O tratamento com MBG preservou o efeito hipocôntrátil do PVAT durante a obesidade (Figura 7.b e c) e não modificou a resposta contrátil em secções com PVAT (Figura 7.a) e sem PVAT (Figura 7.e) dos camundongos controles.

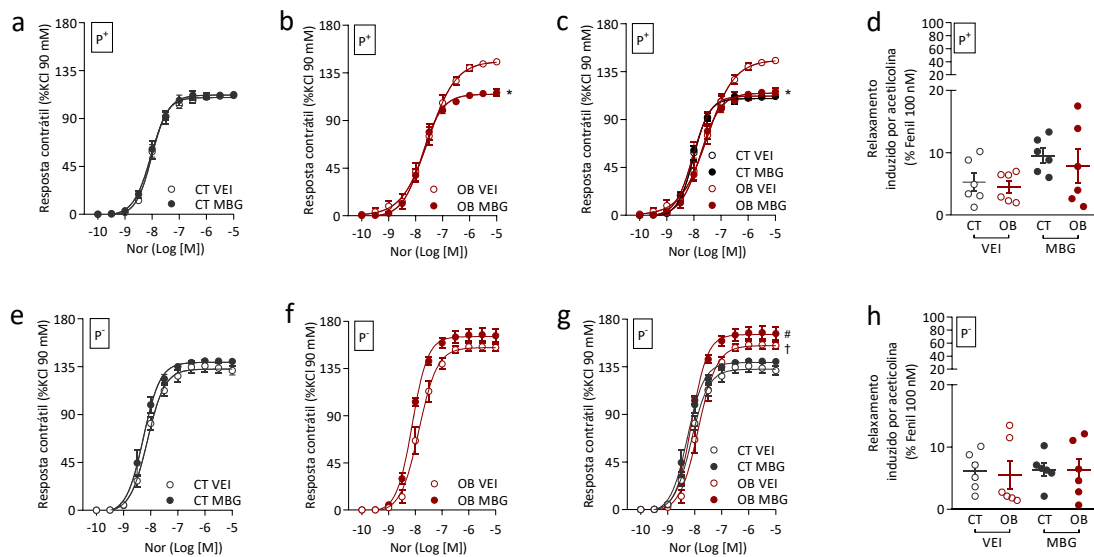


Figura 7. Efeito da administração do MBG na resposta contrátil à NOR. Representação gráfica sigmoide com a taxa porcentual da resposta contrátil à adição cumulativa de NOR (100pM a 10µM) corrigida pelo efeito contrátil induzido pela solução de Krebs KCl 90 mM. (a e b) estudo do efeito da administração do MBG em secções com PVAT preservado. (d e e) estudo do efeito da administração do MBG em secções desprovidas de PVAT. (c) compilado dos dados dos itens a e b. (g) compilado dos dados dos itens e e f. (d e h) taxa porcentual do efeito relaxante promovido por 10 uM de acetilcolina em relação ao efeito contrátil induzido por 100 nM de fenilefrina nas secções utilizadas nessa análise. Os valores da média \pm EPM da $R_{m\acute{a}x}$ de cada curva sigmoide foram utilizados para a comparação estatística por teste t de *student* e análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de Sidak. * $p < 0,05$ vs. grupo obeso VEI. # $p < 0,05$ vs. grupo controle MBG. † $p < 0,05$ vs. grupo controle VEI. $n = 6$. Os valores do pEC_{50} podem ser conferidos no quadro 6.

4.5.3 Influência do NO e da sinalização mediada pelo RA β 3.

A inibição não seletiva da eNOS, mediada pelo L-NAME, bem como, o antagonismo seletivo do RA β 3, mediado pelo SR59230A, anularam o efeito do tratamento com MBG na função hipocontrátil do PVAT nos camundongos obesos (Figura 8.a e b respectivamente).

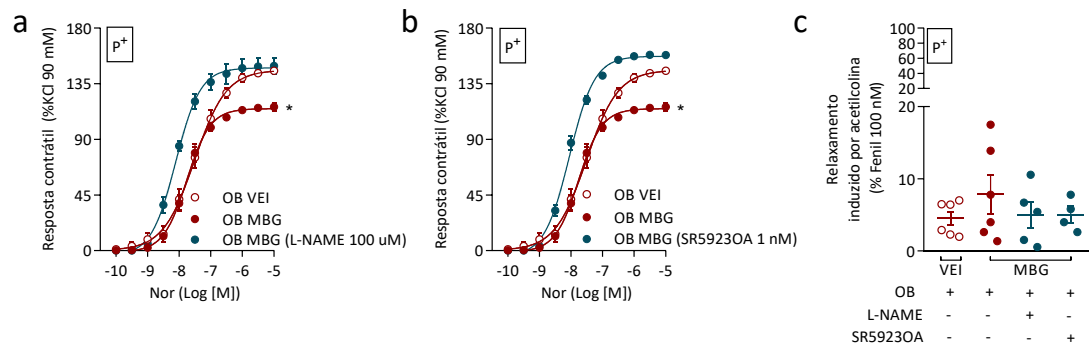


Figura 8. Influência do NO e da sinalização mediada pelo RA β 3 na resposta contrátil à NOR de secções provenientes do grupo OB VEI e OB MBG. Representação gráfica sigmoide com a taxa porcentual da resposta contrátil à adição cumulativa de NOR (100pM a 10 μ M) corrigida pelo efeito contrátil induzido pela solução de Krebs KCl 90 mM. (a) estudo da influência do NO pela adição de 100 μ M de L-NAME (inibidor não seletivo das sintases do óxido nítrico). (b) estudo da influência da sinalização mediada pelo RA β 3 pela adição de 1 nM do antagonista do RA β 3 SR59230A. O L-NAME e o SR59230A foram adicionados 30 minutos antes da adição cumulativa de NOR. (c) taxa porcentual do efeito relaxante promovido por 10 μ M de acetilcolina em relação ao efeito contrátil induzido por 100 nM de fenilefrina nas secções utilizadas nessa análise. Os valores da média \pm EPM da R m áx de cada curva sigmoide foram utilizados para a comparação estatística por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de Sidak. * $p < 0,05$ vs, grupo obeso VEI. $n = 4 - 6$. Os valores da R m áx das secções do grupo OB VEI expostas ao L-NAME e ao SR59230A, bem como, os valores da pEC $_{50}$ podem ser conferidos no quadro 6.

Quadro 6. Valores da $R_{\text{máx}}$ e do pEC_{50} dos estudos em secções aórticas.

	PVAT	CT		OB		n	
		VEI	MBG	VEI	MBG		
$R_{\text{máx}}$	(-)	132,70 ± 1,92	139,10 ± 1,81	155,0 ± 2,61 [#]	165,50 ± 1,98 [#]	6	
	(+)	109,70 ± 1,31 [*]	112,10 ± 1,61 [*]	145,0 ± 3,01 [#]	114,80 ± 1,67 ^{*†}		
pEC_{50}	(-)	8,12 ± 0,04	8,27 ± 0,03	7,86 ± 0,04 [#]	8,11 ± 0,03 [†]		
	(+)	8,01 ± 0,03	8,03 ± 0,04	7,51 ± 0,05 [#]	7,76 ± 0,04		
L-NAME 100 µM							
$R_{\text{máx}}$	(-)	146,80 ± 2,41 [‡]	-	160,9 ± 2,39	165,50 ± 4,19		5 - 6
	(+)	129,20 ± 1,31 [‡]	-	140,4 ± 2,473	147,80 ± 2,53 [‡]		
pEC_{50}	(-)	8,32 ± 0,06	-	7,80 ± 0,04 [#]	8,09 ± 0,08		
	(+)	8,09 ± 0,10	-	7,48 ± 0,04 [#]	8,10 ± 0,05 [‡]		
SR592304 1 nM							
$R_{\text{máx}}$	(-)	137,40 ± 2,12	-	-	-	4 - 5	
	(+)	125,0 ± 1,704 [‡]	-	142,50 ± 7,23	157,30 ± 1,34 [‡]		
pEC_{50}	(-)	8,22 ± 0,04	-	-	-		
	(+)	8,08 ± 0,04	-	7,40 ± 0,14 [#]	8,04 ± 0,02 [‡]		

Quadro 6. Valores da $R_{\text{máx}}$ e do pEC_{50} dos estudos de resposta contrátil. Valores apresentados como média ± EPM. Valores obtidos pelo melhor ajuste à curva concentração-efeito não linear pela equação logística com forma sigmoide. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores com teste de comparações múltiplas de *Sidak* ou teste t de *student*. * $p < 0,05$ vs. a $R_{\text{máx}}$ de secções desprovidas de PVAT do respectivo grupo que recebeu o mesmo tratamento. # $p < 0,05$ vs. a $R_{\text{máx}}$ de secções com a mesma condição de PVAT do grupo CT que recebeu VEI. † $p < 0,05$ vs. o mesmo parâmetro de secções com a mesma condição de PVAT do grupo OB que recebeu VEI. ‡ $p < 0,05$ vs. o mesmo parâmetro do respectivo grupo que não foram expostos ao L-NAME ou SR592304.

4.6 Western blot e quantificação sérica de nitrito.

4.6.1 Análise da razão do conteúdo proteico da $eNOS_f^{ser1177}$ pela $eNOS_t$ no PVAT.

A obesidade não modificou a razão $eNOS_f^{ser1177}/eNOS_t$ e o tratamento com MBG aumentou esse parâmetro nos camundongos obesos (Figura 9).

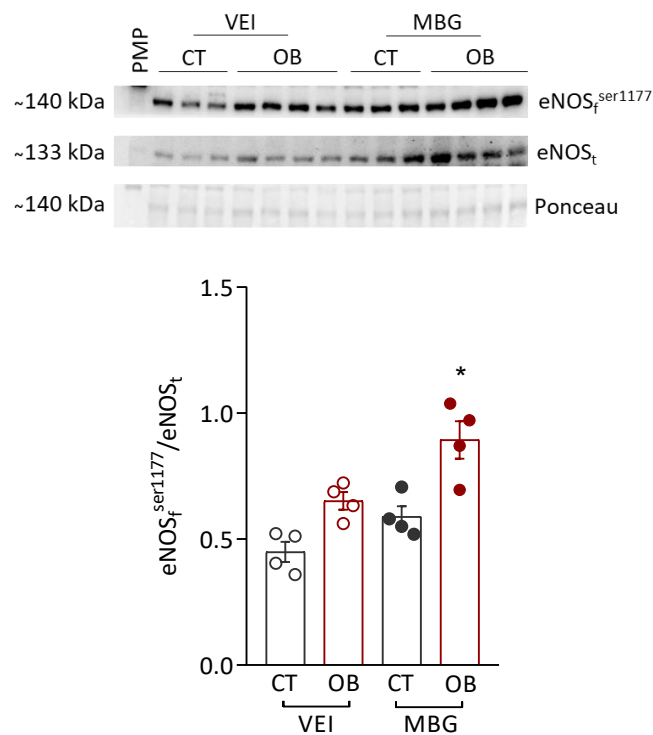


Figura 9. Razão do conteúdo proteico da $eNOS_f^{ser1177}$ pela $eNOS_t$ no PVAT. Análise estatística dos pixels das bandas (U.A.) adquiridas pela técnica de western blot. Na parte superior do gráfico se observa a fotografia representativa da membrana. O protocolo foi aplicado utilizando-se das proteínas totais do PVAT. A quantidade de pixels emitidos na imagem eletrônica das bandas proteicas coradas com solução de Ponceau 1% foi utilizada como fator normalizador do conteúdo proteico de cada coluna da membrana. Cada barra representa a média \pm EPM. $n = 4$. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * $p < 0,05$ vs. grupo obeso VEI. PMP = peso molecular padrão.

4.6.2 Determinação do conteúdo proteico do RA β 3 no PVAT.

A obesidade não modificou o conteúdo proteico do RA β 3 no PVAT e a administração do MBG aumentou esse parâmetro nos camundongos obesos (Figura 10).

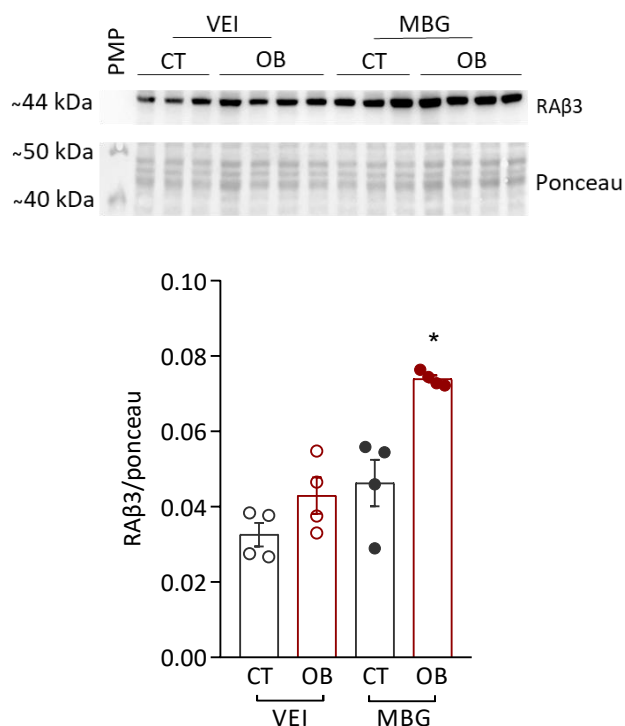


Figura 10. Conteúdo proteico do RA β 3 no PVAT. Análise estatística dos pixels (U.A.) adquiridas pela técnica de western blot. Na parte superior ao gráfico se observa a fotografia representativa da membrana. O protocolo foi aplicado utilizando-se das proteínas totais do PVAT. A quantidade de pixels emitidos na imagem eletrônica das bandas proteicas coradas com solução de Ponceau 1% foi utilizada como fator normalizador do conteúdo proteico de cada coluna da membrana. Cada barra representa a média \pm EPM. n = 4. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * p < 0,05 vs. grupo obeso VEI. PMP = peso molecular padrão.

4.6.3 Determinação do conteúdo proteico do RA β 1 no PVAT.

A obesidade não modificou o conteúdo proteico do RA β 1 no PVAT, e a administração do MBG aumentou esse parâmetro nos camundongos obesos (Figura 11).

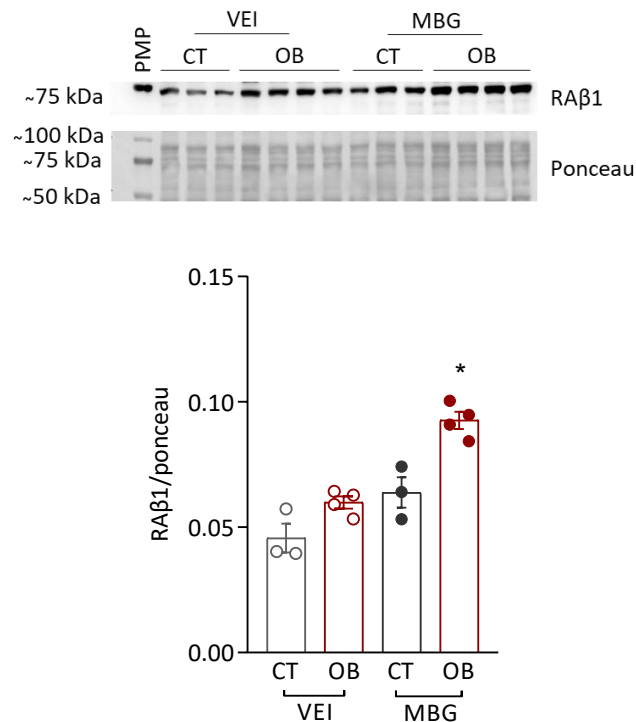


Figura 11. Conteúdo proteico do RA β 1 no PVAT. Análise estatística dos pixels das bandas (U.A.) adquiridas pela técnica de western blot. Na parte superior ao gráfico se observa a fotografia representativa da membrana. O protocolo foi aplicado utilizando-se das proteínas totais do PVAT. A quantidade de pixels emitidos na imagem eletrônica das bandas proteicas coradas com solução de Ponceau 1% foi utilizada como fator normalizador do conteúdo proteico de cada coluna da membrana. Cada barra representa a média \pm EPM. n = 3 - 4. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * p < 0,05 vs. grupo obeso VEI. PMP = peso molecular padrão.

4.6.4 Determinação do conteúdo proteico do RA β 2 no PVAT.

O tratamento com MBG diminuiu o conteúdo proteico da subunidade de 47 kDa do RA β 2 nos camundongos controles, enquanto, o conteúdo proteico da subunidade de 67 kDa do RA β 2 esteve semelhante entre os 4 grupos experimentais (Figura 12).

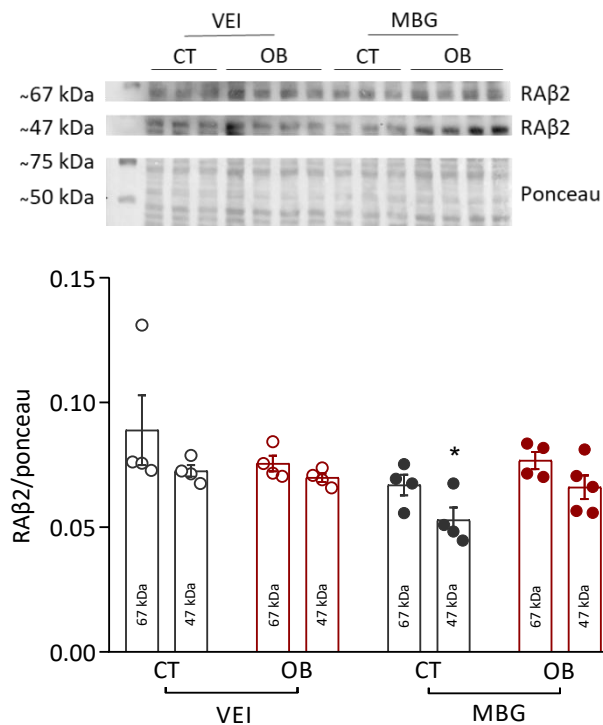


Figura 12. Conteúdo proteico do RA β 2 pela sua detecção em dois pesos moleculares no PVAT. Análise estatística dos pixels das bandas (U.A.) adquiridas pela técnica de western blot. Superiormente ao gráfico se observa a fotografia representativa da membrana. O protocolo foi aplicado utilizando-se das proteínas totais do PVAT. A quantidade de pixels emitidos na imagem eletrônica das bandas proteicas coradas com solução de Ponceau 1% foi utilizada como fator normalizador do conteúdo proteico de cada coluna da membrana. Cada barra representa a média \pm EPM. $n = 4 - 5$. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * $p < 0,05$ vs. a mesma subunidade do grupo controle VEI. PMP = peso molecular padrão.

4.6.5 Determinação do conteúdo proteico da GC α e da GC β na aorta.

O conteúdo proteico aórtico da GC α esteve semelhante entre os 4 grupos experimentais, ao passo que, a obesidade elevou o conteúdo da GC β e o tratamento com MBG, atenuou esse parâmetro durante a obesidade (Figura 13).

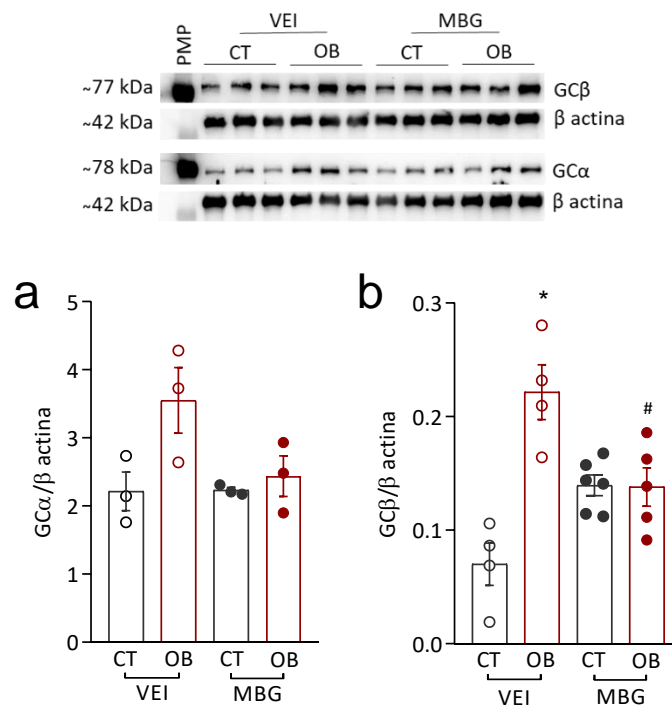


Figura 13. Conteúdo proteico da GC α e da GC β na artéria aorta torácica. Análise estatística dos pixels das bandas (U.A.) adquiridas pela técnica de western blot. Na parte superior ao gráfico se observa a fotografia representativa das membranas. O protocolo foi aplicado utilizando-se das proteínas totais da artéria aorta. A quantidade de pixels emitidos na imagem eletrônica de bandas proteicas coradas com solução de Ponceau 1% foi utilizada como fator normalizador do conteúdo proteico de cada coluna da membrana. Cada barra representa a média \pm EPM. $n = 3 - 6$. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * $p < 0,05$ vs. grupo controle VEI. # * $p < 0,05$ vs. grupo obeso VEI. PMP = peso molecular padrão.

4.6.6 Determinação da concentração sérica de nitrito dos camundongos.

A obesidade atenuou a concentração sérica de nitrito dos camundongos, à medida que, a administração do MBG aumentou esse parâmetro tanto para os camundongos controles, quanto para os obesos (Figura 14).

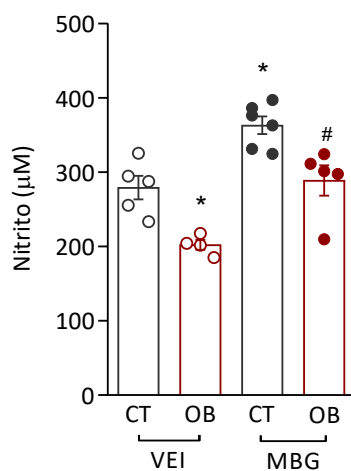


Figura 14. Concentração sérica de nitrito. A reação de Griess foi utilizada para determinação da concentração (μM) sérica de nitrito. Cada barra representa a média \pm EPM. $n = 4 - 6$. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * $p < 0,05$ vs. grupo controle VEI. # $p < 0,05$ vs. grupo obeso VEI.

4.7 Determinação do conteúdo proteico da UCP1 no PVAT.

A obesidade elevou o conteúdo proteico da UCP1 (proteína desacopladora 1) no PVAT, e a administração do MBG não alterou esse parâmetro (Figura 15).

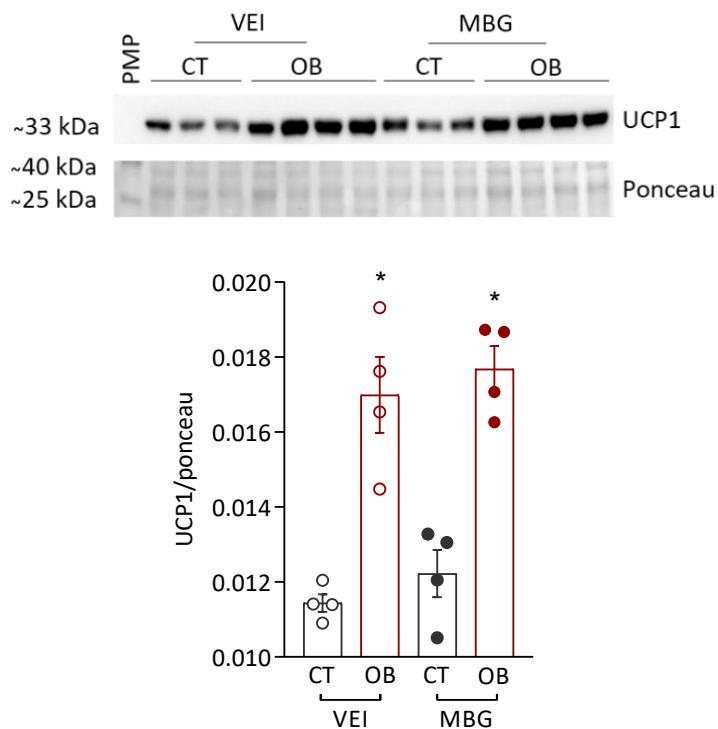


Figura 15. Conteúdo proteico da UCP1 no PVAT. Análise estatística dos pixels das bandas (U.A.) adquiridas pela técnica de western blot. Superiormente ao gráfico se observa a fotografia representativa da membrana. O protocolo foi aplicado utilizando-se das proteínas totais do PVAT. A quantidade de pixels emitidos na imagem eletrônica das bandas proteicas coradas com solução de Ponceau 1% foi utilizada como fator normalizador do conteúdo proteico de cada coluna da membrana. Cada barra representa a média \pm EPM. $n = 4$. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * $p < 0,05$ vs. o grupo controle submetido ao respectivo tratamento. PMP = peso molecular padrão.

4.8 Determinação da geração de ROS no PVAT.

A obesidade aumentou a geração de ROS no PVAT dos camundongos, enquanto, o tratamento com MBG não modificou esse parâmetro (Figura 16).

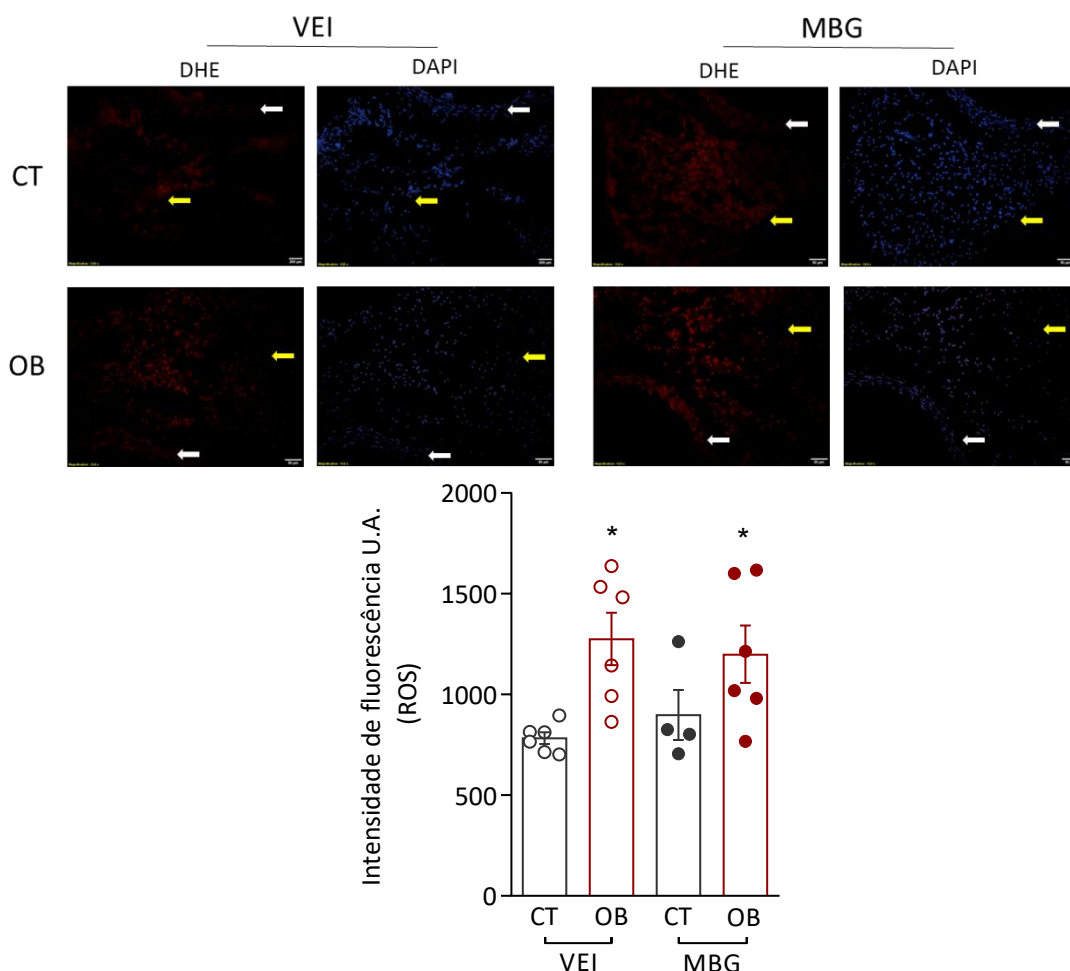


Figura 16. Geração de ROS no PVAT. Análise estatística dos valores de intensidade de fluorescência emitida. Superiormente ao gráfico se observa a fotografia representativa. Cortes transversais de secções aórticas com PVAT preservado (5 μ m) foram expostos aos fluoróforos DHE e DAPI e submetidos a microscopia fluorescente. Seta branca indica aorta e seta amarela o PVAT. A intensidade de fluorescência (U.A.) foi analisada padronizando o mesmo número de células de cada seguimento e normalizada pela área observada. Cada barra representa a média \pm EPM. n = 4 - 6. A comparação estatística foi realizada por análise de variância de 2 fatores e teste de comparações múltiplas de *Sidak*. * p < 0,05 vs. grupo controle VEI.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados desse estudo demonstraram que: 1. o MBG preveniu a perda do efeito hipocontrátil do PVAT durante a obesidade; 2. o MBG aumentou a razão do conteúdo proteico da $eNOS_f^{1177}/eNOS_t$ e do RA β_3 no PVAT; 3. a síntese do NO e o agonismo do RA β_3 são importantes no mecanismo de preservação da função hipocontrátil induzida pelo MBG; 4. o MBG preveniu o aumento da concentração sérica da LDL e a diminuição da tolerância à glicose durante a obesidade. Os resultados apoiam a hipótese de que o tratamento com MBG preserva o efeito hipocontrátil do PVAT aórtico durante a obesidade e que o aumento da síntese de NO contribui nesse contexto.

A dieta rica em gordura é amplamente utilizada para indução da obesidade em animais experimentais e ajuda a entender o mecanismo de doenças relacionadas. As dietas hipercalóricas utilizadas para indução da obesidade, costumam ter de 45% a 60% de gordura²⁴⁰⁻²⁴⁴. Várias gorduras dietéticas são utilizadas, como óleo de milho, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de girassol e banha²⁴⁵. A diferença entre as gorduras da dieta é o conteúdo de três tipos de ácidos graxos, que incluem os saturados, os monoinsaturados e os poliinsaturados. A banha e o óleo de palma, contêm mais ácidos graxos saturados comparados aos outros óleos, a ingestão excessiva dessas gorduras afeta significativamente a microbiota intestinal e o peso corporal²⁴⁶.

Um estudo que realizou a comparação da fonte de gordura no aumento da massa corporal, colesterol, HDL e LDL, evidenciou que a banha atua de forma semelhante às dietas ricas em óleo de milho, óleo de amendoim, óleo de soja ou óleo de girassol²⁴⁵. Por outro lado, a banha realiza uma disbiose intestinal muito mais severa do que as dietas ricas dos óleos supracitados²⁴⁵. Ao que se sabe, o tipo de ácido graxo é mais importante do que o tipo de fonte da dieta, no desenvolvimento das características relacionadas à obesidade²⁴⁵.

No presente estudo, não foi verificado um efeito de perda de peso induzida pelo MBG, dado evidenciado pela análise da massa corporal e do índice de Lee. Apesar de não ter sido o principal alvo desse trabalho, é útil comentar que a busca por medicamentos que reduzem a massa corporal, com o mínimo de prejuízos à saúde, é feita há mais de duas décadas²⁴⁷. A descoberta da subunidade β_3 do RA ocorreu

concomitantemente às buscas por moléculas para tratar a obesidade. No início, foram identificados compostos que ativavam um RA β “atípico” (até então a subunidade β_3 não havia sido descrita) em adipócitos marrons e brancos de roedores²⁴⁷.

Ao fim da década de 1970 e início da década de 1980 três empresas farmacêuticas (Companhia Lilly, Beecham farmacêutica e Hoffmam La Roche) estavam projetando drogas que estimulassem a atividade termogênica e que tivessem a característica antiobesidade em roedores, foram estudados agentes simpatomiméticos não-seletivos. Não foram observados os efeitos desejáveis, de forma particular, houve aumento da frequência cardíaca e de tremor^{248–250}.

Quando o RA β_3 de humanos e de roedores foram clonados e expressos em linhagens celulares, ficou claro que suas sinalizações diferiam entre as espécies^{251–253}. O RA β_3 é abundantemente expresso no TAB e no TAM de roedores, onde medeia a lipólise e a termogênese^{254,255}. Em humanos, a quantidade do mRNA do RA β_3 parece ser muito mais baixa nesses tecidos. O transcrito foi identificado inicialmente no TAM perirenal infantil e em vários depósitos de TAB em adultos^{256,257}, enquanto, sua presença proteica foi identificada posteriormente através do uso de um anticorpo monoclonal direcionado contra o receptor humano^{258,259}.

Um dos maiores obstáculos no estudo da função metabólica do RA β_3 em humanos é representado pela carente presença do RA β_3 no TAM de adultos. No entanto, estudos têm trazido um entendimento mais claro sobre isso^{260,261}. O'Mara e colaboradores, estudaram o efeito da administração diária de 100 mg de MBG por 4 semanas em 14 indivíduos homens, com IMC acima de 25,4. Apesar de haver melhoras em parâmetros metabólicos, não foi verificada perda de peso induzida pelo tratamento com MBG²⁶². Baskin e colaboradores observaram por meio de tomografia computadorizada que a administração única de 200 mg de MBG em indivíduos com IMC normal, pode aumentar a atividade metabólica do TAM interescapular²⁶³. Apesar dos trabalhos de O'Mara e Baskin, utilizarem doses acima da aprovada para o tratamento de bexiga hiperativa, seus estudos sugerem o potencial uso do MBG em condições de doenças metabólicas, mas, não eficaz para perda de peso.

No atual estudo, o consumo de ração e ingestão calórica dos camundongos controles, se elevou quando se realizou a administração do MBG. No trabalho de Fujimoto e colaboradores, a administração intraperitoneal do agonista do RA β 3, CL-316243, foi eficiente em aumentar marcadores da glicólise, gliconeogênese, da função da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, da biossíntese de proteínas, do metabolismo de glicerolípídios e do transporte de fosfato de glicerol no TAM interescapular, bem como, no TAB inguinal e epididimal ²⁶⁴. Em humanos, o MBG pode aumentar a atividade metabólica do tecido adiposo interescapular ²⁶³. Sugere-se portanto, que nesse estudo, o MBG atuou melhorando o consumo energético dos camundongos e por isso, se observou um aumento do consumo alimentar, sem aumento da massa corporal.

A obesidade determinou o aumento da massa do TAM interescapular e dos TABs retroperitoneal, epididimal e inguinal. O tratamento com MBG, foi eficaz em atenuar esse parâmetro para o TAB retroperitoneal. Os tecidos adiposos da região abdominal não formam apenas um depósito de gordura local, mas, também atuam como órgãos endócrinos que secretam várias adipocinas, como a adiponectina e a leptina. Além disso, o fluxo de ácidos graxos livres do tecido adiposo abdominal para o fígado resulta em distúrbios da glicemia e do metabolismo lipídico ²⁶⁵, que contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina e dislipidemia, principalmente em indivíduos com síndrome metabólica ^{266,267}. O sangue do tecido adiposo da região peritoneal, é drenado pela veia porta para o fígado, enquanto, o sangue da gordura da região retroperitoneal é drenado para os rins, pâncreas ou diretamente para a veia cava ²⁶⁸.

Chi-Sheng H. e colaboradores, estudaram em pouco mais de 400 indivíduos incluindo homens e mulheres, pela técnica de tomografia computadorizada, a correlação entre a gordura retroperitoneal e a síndrome metabólica. Foi observado que a área da gordura retroperitoneal se correlaciona positivamente à síndrome metabólica, à concentração plasmática de adipocinas, à inflamação sistêmica e à hipertensão ²⁶⁹. No presente trabalho, a diminuição do peso úmido do TAB retroperitoneal observado nos camundongos obesos, quando se realizou a administração do MBG, é um dado

moderadamente vago, no que se diz respeito a função metabólica do tecido, mas, certamente desperta interesse em torno do efeito do MBG nesse tecido adiposo específico, a considerar a importante influência do mesmo, em condições de síndrome metabólica ²⁶⁹.

Em relação à atividade sérica das enzimas AST e ALT, observou-se que a obesidade aumentou esse parâmetro para a enzima ALT, e que o tratamento com MBG não o modificou. A análise da atividade sérica das aminotransferases AST e ALT pode ser considerada como marcador de função hepática, quando associada as análises de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, bilirrubina total, conjugada ou não conjugada e tempo de protrombina ²⁷⁰. As enzimas AST e ALT participam da gliconeogênese, catalisando a transferência de grupos amino do ácido aspártico ou alanina para o ácido cetoglutárico para produzir ácido oxaloacético e ácido pirúvico, respectivamente. A AST está presente como isoenzima citosólica e mitocondrial e é encontrada no fígado, músculo cardíaco, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e células vermelhas ²⁷¹. A ALT é uma enzima com atividade citosólica encontrada no fígado ²⁷².

Uma vez que não se realizou outros testes de função hepática, o resultado da análise de atividade sérica da AST e da ALT, tem um significado mais abrangente, podendo significar tanto uma sobrecarga da função hepática, como uma disfunção colestatia, ou ainda, os dois fatores concomitantes ²⁷³. Tanto a AST como a ALT são correlacionadas positivamente à obesidade ²⁷⁴ e devem ser avaliadas considerando o histórico e condições de saúde do indivíduo ²⁷⁵. A dieta hiperlipídica utilizada para induzir obesidade em camundongos, pode ser causa de uma importante disfunção hepática ²⁷⁶, no presente estudo, é possível que a sobrecarga hipercalórica oriunda da dieta hiperlipídica esteja contribuindo para a disfunção hepática. Neste estudo, um dos objetivos foi verificar se a dose administrada do MBG não estaria sendo prejudicial ao sistema hepatobiliar. Verificou-se que a administração por 30 dias de 10 mg de MBG não modificou a atividade sérica das enzimas AST e ALT.

A obesidade elevou a concentração sérica de colesterol, HDL, LDL, e causou uma diminuição da tolerância oral à glicose nos camundongos obesos. A síntese de HDL

ocorre no fígado e nos intestinos. A primeira etapa da síntese de HDL envolve a produção de sua principal apolipoproteína estrutural, a Apo-A1. A Apo-A1 é a proteína estrutural da HDL e recebe colesterol e fosfolípidios dos enterócitos e hepatócitos pelas proteínas reguladoras do efluxo de colesterol, como o ABCA1 (transportador transmembranar dependente de ATP), formando a HDL pré-beta. À medida que a HDL toma à circulação sanguínea ela também recebe colesterol livre e fosfolípidios dos tecidos periféricos, dos quilomícrons e de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL; lipoproteína de densidade muito baixa) ²⁷⁷, e se direciona ao fígado onde será captada por vias especializadas ^{278,279}.

A concentração sérica elevada da HDL está associada à um risco reduzido de doença cardíaca coronária. A manutenção da concentração sérica normal da HDL desempenha um papel na prevenção do risco cardiovascular ²⁸⁰. Por outro lado, a LDL atua como o transportador predominante do colesterol sérico (cerca de 67%), essa partícula entrega o colesterol aos tecidos, como as glândulas supra-renais e gônadas ²⁸¹. Quando há excesso de ácidos graxos e colesterol, eles são convertidos em triacilgliceróis e ésteres de colesterol, respectivamente, no fígado e condicionados com apolipoproteínas na VLDL ²⁸²⁻²⁸⁴. Os ácidos graxos livres são absorvidos pelos tecidos adiposos, onde são armazenados como triacilgliceróis. Após a remoção parcial do triacilglicerol, são formados remanescentes de VLDL, a remoção adicional de triacilglicerol produz a LDL, o produto final do metabolismo da VLDL ²⁸²⁻²⁸⁴.

A LDL transporta o colesterol para os tecidos destinatários, que possuem receptores de LDL em suas membranas plasmáticas. A partícula da LDL é captada por endocitose mediada por receptor ²⁸²⁻²⁸⁴. Durante a obesidade pode haver o acúmulo da LDL circulante e nesses casos, o excesso da LDL pode permear a íntima vascular e se acumular como lesões gordurosas, um passo inicial da aterosclerose. Está demonstrado, que a forma nativa da LDL não causa acúmulo de lipídeos; ao passo que as formas modificadas da LDL, como oxidada, acetilada e glicada, possuem propriedades pró-aterogênicas. Embora ainda não tenha sido comprovado, a melhor hipótese é que a LDL modificada oxidativamente promove a formação de células espumosas podendo desencadear vias inflamatórias ²⁸⁵.

Na presente investigação, foi verificado um efeito preventivo do MBG em relação ao aumento da concentração sérica da LDL que ocorre na obesidade. Negres S. e colaboradores em 2017, estudaram os efeitos antidiabético e hipolipemiante de 13 moléculas agonistas do RA β 3, em animais com diabetes. Foi evidenciado que algumas dessas moléculas foram capazes de atenuar a concentração sérica de colesterol total, da LDL e de triglicerídeos ²⁸⁶. Por outro lado, um estudo clínico que investigou o efeito da administração diária de 50 mg de MBG por 12 meses em parâmetros metabólicos de pacientes obesos, não verificou atenuação da concentração sérica da LDL induzida pelo MBG ²⁸⁷. No que se refere ao mecanismo do efeito hipolipemiante mediado pelo agonismo do RA β 3, há algumas sugestões. A administração do BRL37344 (agonista do RA β 3) à camundongos com deleção gênica da ApoE (apolipoproteína E), foi capaz de aumentar a concentração sérica da ApoA1, bem como suas frações proteicas e do mRNA no fígado ²⁸⁸. Ademais, é sugerido que agonismo do RA β 3 estimula a síntese de adiponectina que consequentemente contribui para a síntese da ApoA1 e do ABCA1 ²⁸⁹, que juntos realizam o transporte do excesso de colesterol circulante para o fígado ^{290,291}.

Humanos e camundongos respondem de forma diferente aos efeitos metabólicos do agonismo do RA β 3, os camundongos têm maior susceptibilidade ao recrutamento do TAM, que por diversas vias, pode ser responsável pela melhora no perfil metabólico ²⁹². Já em humanos, o recrutamento e ativação do TAM pode ser diferente a depender do peso, idade ou condição metabólica do organismo ^{293,294}. Em alguns estudos, foi necessária uma dose elevada (200 mg) de MBG para se verificar a ativação do TAM em humanos ^{295,296}. Pode ser interessante, realizar um estudo com intenções de esclarecer os mecanismos que orquestram a atenuação da concentração sérica da LDL induzida pelo MBG.

O MBG preveniu a diminuição da tolerância à glicose induzida pela obesidade. Sabe-se que a oferta da dieta rica em gordura em camundongos está associada a um aumento da proliferação de células β no pâncreas, seguido do desenvolvimento de resistência à insulina ²⁹⁷. A intolerância à glicose observada na obesidade, sugere que os mecanismos moleculares responsáveis pelo metabolismo hepático da glicose estão comprometidos. Dados de animais experimentais e dados limitados de estudos em

humanos demonstram uma diminuição no número e na função do receptor de insulina hepático em condições de obesidade ^{298,299}. Uma das limitações desse estudo, é que não foi realizado o teste de tolerância à insulina.

O efeito do agonismo do RA β 3 na melhora do metabolismo da glicose já é conhecido ^{300,301}. Em humanos a administração diária de 50 mg de MBG por 12 meses à pacientes obesos, foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina ²⁸⁷, que indiretamente melhora a tolerância à glicose. A hipótese mais aceita para isso, é que o agonismo do RA β 3 pode estar associado ao aumento da massa e função dos TAMs ^{302,303}. A verificação dos parâmetros metabólicos aqui mencionados, é muito importante, já que as complicações cardiovasculares, podem se dever em grande parte pela cronicidade de disfunções no perfil lipídico ou glicêmico ¹¹. O segundo grande conjunto de resultados, do presente trabalho, está correlacionado aos efeitos vasculares do MBG durante a obesidade.

Indivíduos com obesidade possuem prejuízo da função aórtica ^{304,305}. Fisiologicamente, a aorta mantém baixa pós-carga ventricular esquerda, promove o fluxo sanguíneo coronário subendocárdico ideal e transforma o fluxo sanguíneo pulsátil em laminar ³⁰⁶. O aumento de rigidez na aorta ou alterações na sua mecânica pode culminar em aumento da pressão sistólica ventricular esquerda, diminuição do suprimento sanguíneo na região subendocárdica ³⁰⁷ e muitas vezes estão associadas à doença arterial coronariana ³⁰⁸, hipertensão ³⁰⁹, diabetes ³¹⁰ e hipercolesterolemia ³¹¹; distúrbios que são mais comuns à obesidade.

Não é simples determinar o efeito independente da obesidade na função vascular, mas o estudo de secções arteriais isoladas é uma alternativa. No presente trabalho, decidiu-se que todos os estudos funcionais em secções aórticas fossem realizados após a fricção mecânica à camada íntima vascular com intuito de atenuar a função endotelial, já que em alguns casos pode haver uma “comunicação” do PVAT com a camada endotelial na produção do efeito hipocontrátil ³¹².

O efeito predominante contrátil da NOR no tecido vascular isolado se dá pela maior quantidade dos RA α em detrimento dos RA β nesse tecido, mas, a verificação da diminuição de sua potência em secções com PVAT preservado, se deve em parte pela

presença do RA β 3 no tecido perivascular, que leva a ativação de vias de sinalização da AC com aumento do cAMP e a liberação do NO ⁷³. O efeito hipocontrátil do PVAT, também ocorre em resposta à ET-1, fenilefrina, ANG II e serotonina ^{60,61}, nesses casos, os RA β s podem não ser imprescindíveis.

A diminuição ou perda do efeito hipocontrátil do PVAT durante a obesidade se deve à diversos fatores. A liberação basal do NO mostrou ser reduzida em pequenas artérias de pacientes obesos em comparação com pacientes não obesos ¹²⁹. No PVAT da aorta torácica de camundongos obesos induzidos por dieta, a função da eNOS pode estar prejudicada, por desacoplamento, bem como, redução da sua fosforilação no resíduo de serina 1177 ¹³². A hipóxia, o estresse oxidativo e a inflamação, também podem contribuir de alguma forma para a diminuição do efeito hicontrátil do PVAT durante a obesidade ¹⁴⁶.

O tratamento com MBG preservou a função hipocontrátil do PVAT durante a obesidade. A síntese local do NO e o agonismo do RA β 3, medeia a repercussão vascular do tratamento com MBG.

O NO é um radical livre gasoso de curta duração e a sua detecção direta em tecidos ou células representa um desafio bioanalítico ³¹³. Um dos métodos mais comuns para avaliar a competência de determinado tecido ou célula para produzir o NO é pela detecção das formas fosforiladas da eNOS ^{314,315}. Apesar desse tipo de inferência já ter sido colocada em questão ³¹⁶, a análise da fosforilação da eNOS no resíduo de serina 1177, é considerada uma evidência para a sua ativação ^{317,318}.

O MBG elevou o conteúdo proteico da eNOS no PVAT dos camundongos obesos. Em outro estudo, a infusão por 3 dias do CL316243 (agonista do RA β 3) restaurou os níveis do NO na aorta de coelhos hiperglicêmicos, esse efeito pode ser o resultado da diminuição da geração de ROS, que melhora a biodisponibilidade do NO e reduz a glutatilonilação da eNOS tornando-a menos suscetível à regulação redox ³¹⁹. No corrente estudo, não se pode sugerir um efeito antioxidante do MBG, já que, os resultados da fluorescência emitida pela sonda de DHE evidenciou que o MBG não atenuou a geração de ROS no PVAT dos camundongos obesos. Em pequenas artérias ³²⁰ e em cardiomiócitos ³²¹ o agonismo do RA β 3 aumenta a fosforilação da eNOS. O agonismo do

RA β 3 aumenta a atividade da AKT (proteína quinase B) contribuindo para a fosforilação da eNOS ³²¹.

Quanto à participação do RA β 3 no efeito hipocontrátil do PVAT mediado pela NOR, alguns mecanismos são propostos. No TAM, o agonismo do RA β 3 acoplado à proteína Gs leva à ativação da AC e sinalização intracelular mediada pelo cAMP e pela PKA ³²². No PVAT, a estimulação do RA β 3 pela NOR leva à ativação da AC com aumento da mobilização do cAMP e a liberação do NO ⁷³.

O MBG aumentou o conteúdo proteico do RA β 3 no PVAT dos camundongos obesos, isso pode ter contribuído para uma atuação prevalente desse receptor no efeito hipocontrátil da NOR. Em consonância com nossos resultados, foi demonstrado que o tratamento com agonista do RA β 3 aumenta o conteúdo proteico do RA β 3 no miocárdio de pacientes com IC ³²³, e também em animais experimentais com IC ³²⁴. Os RA β 3s, foram considerados resistentes à dessensibilização induzida por agonista devido à ausência de sequências de resíduos de serina e treonina direcionadas para quinases dos GPCR e fosforilação da PKA na terceira alça intracelular ³²⁵. Sugere-se, que no presente trabalho, o aumento do conteúdo proteico se deva a baixa capacidade de dessensibilização do RA β 3. Além disso, o MBG aumentou o conteúdo do RA β 1 no PVAT dos camundongos obesos. No entanto, o efeito hipocontrátil da NOR foi totalmente abolido pela incubação com o SR592304 (antagonista do RA β 3), sugerindo uma ínfima participação do RA β 1 nesse contexto.

O conteúdo da GC na aorta dos camundongos foi verificado. A GC solúvel, é a principal mediadora do efeito vasorelaxante do NO ³²⁶. A obesidade elevou o conteúdo proteico da GC β na aorta e o MBG preveniu esse aumento. O efeito da obesidade no conteúdo proteico da GC, pode variar de acordo com tecido estudado. Na artéria carótida de ratos, o conteúdo proteico da GC β não foi modificado pela obesidade ³²⁷. Do mesmo modo, resultados semelhantes foram obtidos no córtex renal de ratos ³²⁸. Por outro lado, na bexiga de camundongos o conteúdo proteico das subunidades α e β da GC foi diminuído pela obesidade ³²⁹.

No que se refere à concentração sérica de nitrito, o MBG preveniu a diminuição desse parâmetro induzida pela obesidade. Em pacientes com disfunção endotelial

resultante de hipertensão, diabetes ou aterosclerose, uma concentração reduzida de nitrito plasmático foi relatado ³³⁰. Acredita-se que 70% do nitrito sérico advém da atividade da eNOS ³³¹, o que o torna um representante indireto da biodisponibilidade do NO. Observou-se uma diminuição de nitrito sérico concomitante ao aumento da GC aórtica, durante a obesidade. Esses dados, sugerem que o MBG possa atuar como um regulador da síntese e sinalização do NO durante a obesidade.

O presente trabalho, não é o primeiro a propor um tratamento farmacológico para prevenir a perda da função hipocontrátil do PVAT em situações de doença. Já foi verificado, que a rosiglitazona ¹⁵², a artovastatina ¹⁵³, agonistas do receptor canabinoide CB1 ¹⁵², antagonistas de citocinas ¹⁴², metformina ^{156,157} e o hormônio melatonina ¹⁵⁵ podem de alguma maneira tornar o PVAT mais saudável e melhorar a sua função hipocontrátil.

O MBG é o unico medicamento agonista do RAβ3 aprovado pela FDA até o momento, talvez por isso seja alvo de alguns estudos clínicos ³³²⁻³³⁴. Os efeitos metabólicos do MBG já foram testados em humanos eutróficos ³³⁵ e obesos ²⁸⁷ e sua segurança cardiovascular também ²²⁷.

Sabe-se, que a melhora da função hipocontrátil do PVAT está associada à uma reversão da hipertensão induzida pela obesidade, restauração do tamanho dos adipócitos, e restabelecimento da função da eNOS ¹³³. Em ratos obesos, a melhora do efeito hipocontrátil do PVAT induzida por medicamentos está relacionado ao aumento da sensibilidade à insulina, redução dos níveis de insulina em jejum e da concentração de triglicerídeos ¹⁵².

O conjunto de resultados, evidencia tanto efeitos sistêmicos como locais do MBG, não foi possível determinar se o efeito benéfico do MBG sobre o PVAT foi resultado de uma provável “reprogramação metabólica” nos camundongos obesos. Mas a presente pesquisa traz suporte para a apresentação do MBG como um agente preventivo dos prejuízos vasculares mediados pela disfunção do PVAT durante a obesidade.

6. CONCLUSÃO

O tratamento com MBG contribuiu para a manutenção do efeito hipocontrátil do PVAT aórtico torácico durante a obesidade e a síntese do NO e atividade da eNOS, exerce importante papel nesse contexto. O MBG, foi eficiente em prevenir o aumento da concentração sérica da LDL, bem como, a diminuição da tolerância à glicose induzida pela obesidade. Tendo em vista, o importante impacto da repercussão vascular do PVAT, durante a obesidade. O presente trabalho traz luz ao cenário de fármacos aprovados pela FDA, com capacidade de prevenir ou atenuar as consequências vasculares prejudiciais mediadas pelo PVAT durante obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dai, H., Alsalhe, T.A., Chalghaf, N., Riccò, M., Bragazzi, N.L., and Wu, J. (2020). The global burden of disease attributable to high body mass index in 195 countries and territories, 1990–2017: An analysis of the Global Burden of Disease Study. *PLoS Med* 17, e1003198. [10.1371/journal.pmed.1003198](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003198).
2. Dublin, L.I., H.H.Marks. (1930). The influence of weight on certain causes of death. *Hum Biol* 2, 159–184.
3. Jensen, M.D., Ryan, D.H., Apovian, C.M., Ard, J.D., Comuzzie, A.G., Donato, K.A., Hu, F.B., Hubbard, V.S., Jakicic, J.M., Kushner, R.F., et al. (2014). 2013 AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults. *Circulation* 129. [10.1161/01.cir.0000437739.71477.ee](https://doi.org/10.1161/01.cir.0000437739.71477.ee).
4. Ward, Z.J., Bleich, S.N., Long, M.W., and Gortmaker, S.L. (2021). Association of body mass index with health care expenditures in the United States by age and sex. *PLoS One* 16, e0247307. [10.1371/journal.pone.0247307](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247307).
5. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. Obesidade atinge mais de 6, 7 milhões de pessoas no Brasil em 2022.<<https://www.scbm.org.br/obesidade-atinge-mais-de-67-milhoes-de-pessoas-no-brasil-em-2022/>>. Acesso em: 08 de agosto de 2023.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Relatórios do Estado nutricional dos indivíduos acompanhados por período, fase do ciclo da vida e índice. S. de V.A. e Nutricional. 2023. D. em:<<https://sisaps.saude.gov.br/sisvan/relatoriopublico/index>>Acesso em: 08 de agosto de 2023. Brasil. Ministério da Saúde. Relatórios do Estado nutricional dos indivíduos acompanhados por período, fase do ciclo da vida e índice. Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional. 2023. Disponível em:<<https://sisaps.saude.gov.br/sisvan/relatoriopublico/index>>Acesso em: 08 de agosto de 2023.

7. Nilson, E.A.F., Andrade, R. da C.S., Brito, D.A., and Michele Lessa, O. (2020). Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. *Revista Panamericana de Salud Pública* 44, 1. 10.26633/RPSP.2020.32.
8. Batsis, J.A., Sahakyan, K.R., Rodriguez-Escudero, J.P., Bartels, S.J., Somers, V.K., and Lopez-Jimenez, F. (2013). Normal Weight Obesity and Mortality in United States Subjects ≥ 60 Years of Age (from the Third National Health and Nutrition Examination Survey). *Am J Cardiol* 112, 1592–1598. 10.1016/j.amjcard.2013.07.014.
9. Romero-Corral, A., Somers, V.K., Sierra-Johnson, J., Korenfeld, Y., Boarin, S., Korinek, J., Jensen, M.D., Parati, G., and Lopez-Jimenez, F. (2010). Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. *Eur Heart J* 31, 737–746. 10.1093/eurheartj/ehp487.
10. Gómez-Ambrosi, J., Silva, C., Galofré, J.C., Escalada, J., Santos, S., Millán, D., Vila, N., Ibañez, P., Gil, M.J., Valentí, V., et al. (2012). Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *Int J Obes* 36, 286–294. 10.1038/ijo.2011.100.
11. Sahakyan, K.R., Somers, V.K., Rodriguez-Escudero, J.P., Hodge, D.O., Carter, R.E., Sochor, O., Coutinho, T., Jensen, M.D., Roger, V.L., Singh, P., et al. (2015). Normal-Weight Central Obesity: Implications for Total and Cardiovascular Mortality. *Ann Intern Med* 163, 827–835. 10.7326/M14-2525.
12. Piché, M.-E., Poirier, P., Lemieux, I., and Després, J.-P. (2018). Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Prog Cardiovasc Dis* 61, 103–113. 10.1016/j.pcad.2018.06.004.
13. Jensen, M.D., Ryan, D.H., Apovian, C.M., Ard, J.D., Comuzzie, A.G., Donato, K.A., Hu, F.B., Hubbard, V.S., Jakicic, J.M., Kushner, R.F., et al. (2014). 2013

AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults. *Circulation* 129. 10.1161/01.cir.0000437739.71477.ee.

14. Cerhan, J.R., Moore, S.C., Jacobs, E.J., Kitahara, C.M., Rosenberg, P.S., Adami, H.-O., Ebbert, J.O., English, D.R., Gapstur, S.M., Giles, G.G., et al. (2014). A Pooled Analysis of Waist Circumference and Mortality in 650,000 Adults. *Mayo Clin. Proc.* 89, 335–345. 10.1016/j.mayocp.2013.11.011.
15. Coutinho, T., Goel, K., Corrêa de Sá, D., Carter, R.E., Hodge, D.O., Kragelund, C., Kanaya, A.M., Zeller, M., Park, J.S., Kober, L., et al. (2013). Combining Body Mass Index with Measures of Central Obesity in the Assessment of Mortality in Subjects With Coronary Disease. *J Am Coll Cardiol* 61, 553–560. 10.1016/j.jacc.2012.10.035.
16. The Emerging Risk Factors Collaboration (2011). Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. *The Lancet* 377, 1085–1095. 10.1016/S0140-6736(11)60105-0.
17. Neeland, I.J., Ayers, C.R., Rohatgi, A.K., Turer, A.T., Berry, J.D., Das, S.R., Vega, G.L., Khera, A., McGuire, D.K., Grundy, S.M., et al. (2013). Associations of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue with markers of cardiac and metabolic risk in obese adults. *Obesity* 21, E439–E447. 10.1002/oby.20135.
18. Fox, C.S., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Pou, K.M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C.-Y., Vasan, R.S., Murabito, J.M., Meigs, J.B., Cupples, L.A., et al. (2007). Abdominal Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Compartments. *Circulation* 116, 39–48. 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675355.
19. Kwok, K.H.M., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2016). Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* 48, e215–e215. 10.1038/emm.2016.5.

20. CANNON, B., and NEDERGAARD, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 84, 277–359. 10.1152/physrev.00015.2003.
21. Wu, J., Boström, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.-H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., et al. (2012). Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* 150, 366–376. 10.1016/j.cell.2012.05.016.
22. Waldén, T.B., Hansen, I.R., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 302, E19–E31. 10.1152/ajpendo.00249.2011.
23. Reddy, P., Lent-Schochet, D., Ramakrishnan, N., McLaughlin, M., and Jialal, I. (2019). Metabolic syndrome is an inflammatory disorder: A conspiracy between adipose tissue and phagocytes. *Clinica Chimica Acta* 496, 35–44. 10.1016/j.cca.2019.06.019.
24. Freedland, E.S. (2004). Role of a critical visceral adipose tissue threshold (cvatt) in metabolic syndrome: implications for controlling dietary carbohydrates: a review. *Nutr Metab (Lond)* 1, 12. 10.1186/1743-7075-1-12.
25. Björntorp, P. (1990). “Portal” adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.* 10, 493–496. 10.1161/01.ATV.10.4.493.
26. Zhang, F., Hao, G., Shao, M., Nham, K., An, Y., Wang, Q., Zhu, Y., Kusminski, C.M., Hassan, G., Gupta, R.K., et al. (2018). An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. *Cell Metab* 27, 252-262.e3. 10.1016/j.cmet.2017.12.004.
27. Kahn, C.R., Wang, G., and Lee, K.Y. (2019). Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 129, 3990–4000. 10.1172/JCI129187.

28. Lee, M.-W., Lee, M., and Oh, K.-J. (2019). Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. *J Clin Med* 8, 854. 10.3390/jcm8060854.
29. Srivastava, S., and Veech, R.L. (2019). Brown and Brite: The Fat Soldiers in the Anti-obesity Fight. *Front Physiol* 10. 10.3389/fphys.2019.00038.
30. Zuriaga, M.A., Fuster, J.J., Gokce, N., and Walsh, K. (2017). Humans and Mice Display Opposing Patterns of “Browning” Gene Expression in Visceral and Subcutaneous White Adipose Tissue Depots. *Front Cardiovasc Med* 4. 10.3389/fcvm.2017.00027.
31. Fukui, Y., Masui, S., Osada, S., Umesono, K., and Motojima, K. (2000). A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR-gamma activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAy obese mice. *Diabetes* 49, 759–767. 10.2337/diabetes.49.5.759.
32. Lin, H. v., Frassetto, A., Kowalik Jr, E.J., Nawrocki, A.R., Lu, M.M., Kosinski, J.R., Hubert, J.A., Szeto, D., Yao, X., Forrest, G., et al. (2012). Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS One* 7, e35240. 10.1371/journal.pone.0035240.
33. Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 285, 7153–7164. 10.1074/jbc.M109.053942.
34. Chen, L.-H., Chien, Y.-W., Liang, C.-T., Chan, C.-H., Fan, M.-H., and Huang, H.-Y. (2017). Green tea extract induces genes related to browning of white adipose tissue and limits weight-gain in high energy diet-fed rat. *Food Nutr Res* 61, 1347480. 10.1080/16546628.2017.1347480.

35. Baskaran, P., Krishnan, V., Ren, J., and Thyagarajan, B. (2016). Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol* 173, 2369–2389. [10.1111/bph.13514](https://doi.org/10.1111/bph.13514).
36. Ghorbani, M., and Himms-Hagen, J. (1997). Appearance of brown adipocytes in white adipose tissue during CL 316,243-induced reversal of obesity and diabetes in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes* 21, 465–475. [10.1038/sj.ijo.0800432](https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800432).
37. Sahuri-Arisoylu, M., Brody, L.P., Parkinson, J.R., Parkes, H., Navaratnam, N., Miller, A.D., Thomas, E.L., Frost, G., and Bell, J.D. (2016). Reprogramming of hepatic fat accumulation and “browning” of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *Int J Obes* 40, 955–963. [10.1038/ijo.2016.23](https://doi.org/10.1038/ijo.2016.23).
38. den Hartigh, L.J., Wang, S., Goodspeed, L., Wietecha, T., Houston, B., Omer, M., Ogimoto, K., Subramanian, S., Gowda, G.A.N., O’Brien, K.D., et al. (2017). Metabolically distinct weight loss by 10,12 CLA and caloric restriction highlight the importance of subcutaneous white adipose tissue for glucose homeostasis in mice. *PLoS One* 12, e0172912. [10.1371/journal.pone.0172912](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172912).
39. Sidossis, L.S., Porter, C., Saraf, M.K., Børsheim, E., Radhakrishnan, R.S., Chao, T., Ali, A., Chondronikola, M., Mlcak, R., Finnerty, C.C., et al. (2015). Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab* 22, 219–227. [10.1016/j.cmet.2015.06.022](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.022).
40. Neinast, M.D., Frank, A.P., Zechner, J.F., Li, Q., Vishvanath, L., Palmer, B.F., Aguirre, V., Gupta, R.K., and Clegg, D.J. (2015). Activation of natriuretic peptides and the sympathetic nervous system following Roux-en-Y gastric bypass is associated with gonadal adipose tissues browning. *Mol Metab* 4, 427–436. [10.1016/j.molmet.2015.02.006](https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.02.006).
41. Kir, S., White, J.P., Kleiner, S., Kazak, L., Cohen, P., Baracos, V.E., and Spiegelman, B.M. (2014). Tumour-derived PTH-related protein triggers

- adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* 513, 100–104. 10.1038/nature13528.
42. Stanford, K.I., Middelbeek, R.J.W., and Goodyear, L.J. (2015). Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes* 64, 2361–2368. 10.2337/db15-0227.
 43. Shinoda, K., Luijten, I.H.N., Hasegawa, Y., Hong, H., Sonne, S.B., Kim, M., Xue, R., Chondronikola, M., Cypess, A.M., Tseng, Y.-H., et al. (2015). Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat Med* 21, 389–394. 10.1038/nm.3819.
 44. Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., et al. (2012). Human BAT Possesses Molecular Signatures That Resemble Beige/Brite Cells. *PLoS One* 7, e49452. 10.1371/journal.pone.0049452.
 45. Jespersen, N.Z., Larsen, T.J., Peijs, L., Dugaard, S., Homøe, P., Loft, A., de Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., et al. (2013). A Classical Brown Adipose Tissue mRNA Signature Partly Overlaps with Brite in the Supraclavicular Region of Adult Humans. *Cell Metab* 17, 798–805. 10.1016/j.cmet.2013.04.011.
 46. Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967. 10.1038/nature07182.
 47. Shao, M., Wang, Q.A., Song, A., Vishvanath, L., Busbuso, N.C., Scherer, P.E., and Gupta, R.K. (2019). Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited. *Diabetes* 68, 1874–1885. 10.2337/db19-0308.
 48. Ho, E., and Shimada, Y. (1978). Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* 66, 579–585. 10.1016/0012-1606(78)90263-4.

49. Iacobellis, G., Corradi, D., and Sharma, A.M. (2005). Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2, 536–543. 10.1038/ncpcardio0319.
50. Marchington, J.M., Mattacks, C.A., and Pond, C.M. (1989). Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: Structure, foetal development and biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 94, 225–232. 10.1016/0305-0491(89)90337-4.
51. Szasz, T., and Webb, R.C. (2012). Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci* 122, 1–12. 10.1042/CS20110151.
52. Qi, X.-Y., Qu, S.-L., Xiong, W.-H., Rom, O., Chang, L., and Jiang, Z.-S. (2018). Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword. *Cardiovasc Diabetol* 17, 134. 10.1186/s12933-018-0777-x.
53. Yudkin, J.S., Eringa, E., and Stehouwer, C. da (2005). “Vasocrine” signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *The Lancet* 365, 1817–1820. 10.1016/S0140-6736(05)66585-3.
54. Verlohren, S., Dubrovskaja, G., Tsang, S.-Y., Essin, K., Luft, F.C., Huang, Y., and Gollasch, M. (2004). Visceral Periadventitial Adipose Tissue Regulates Arterial Tone of Mesenteric Arteries. *Hypertension* 44, 271–276. 10.1161/01.HYP.0000140058.28994.ec.
55. Police, S.B., Thatcher, S.E., Charnigo, R., Daugherty, A., and Cassis, L.A. (2009). Obesity Promotes Inflammation in Periaortic Adipose Tissue and Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1458–1464. 10.1161/ATVBAHA.109.192658.
56. Yu-Jing Gao (2007). Dual Modulation of Vascular Function by Perivascular Adipose Tissue and Its Potential Correlation with Adiposity/Lipoatrophy-Related Vascular Dysfunction. *Curr Pharm Des* 13, 2185–2192. 10.2174/138161207781039634.

57. Qi, X.-Y., Qu, S.-L., Xiong, W.-H., Rom, O., Chang, L., and Jiang, Z.-S. (2018). Perivascular adipose tissue (PVAT) in atherosclerosis: a double-edged sword. *Cardiovasc Diabetol* 17, 134. 10.1186/s12933-018-0777-x.
58. Soltis, E.E., and Cassis, L.A. (1991). Influence of Perivascular Adipose Tissue on Rat Aortic Smooth Muscle Responsiveness. *Clin Exp Hypertens A* 13, 277–296. 10.3109/10641969109042063.
59. LÖHN, M., DUBROVSKA, G., LAUTERBACH, B., LUFT, F.C., GOLLASCH, M., and SHARMA, A.M. (2002). Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *The FASEB Journal* 16, 1057–1063. 10.1096/fj.02-0024com.
60. Gálvez-Prieto, B., Somoza, B., Gil-Ortega, M., García-Prieto, C.F., de las Heras, A.I., González, M.C., Arribas, S., Arangué, I., Bolbrinker, J., Kreutz, R., et al. (2012). Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. *Front Pharmacol* 3. 10.3389/fphar.2012.00103.
61. Gollasch, M. (2012). Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol* 165, 633–642. 10.1111/j.1476-5381.2011.01430.x.
62. Gálvez-Prieto, B., Bolbrinker, J., Stucchi, P., de las Heras, A.I., Merino, B., Arribas, S., Ruiz-Gayo, M., Huber, M., Wehland, M., Kreutz, R., et al. (2008). Comparative expression analysis of the renin–angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *Journal of Endocrinology* 197, 55–64. 10.1677/JOE-07-0284.
63. GAO, Y., TAKEMORI, K., SU, L., AN, W., LU, C., SHARMA, A., and LEE, R. (2006). Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res* 71, 363–373. 10.1016/j.cardiores.2006.03.013.
64. Lee, Y.-C., Chang, H.-H., Chiang, C.-L., Liu, C.-H., Yeh, J.-I., Chen, M.-F., Chen, P.-Y., Kuo, J.-S., and Lee, T.J.F. (2011). Role of Perivascular Adipose Tissue–Derived Methyl Palmitate in Vascular Tone Regulation and Pathogenesis of Hypertension. *Circulation* 124, 1160–1171. 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.027375.

65. Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89, 1025–1078. 10.1152/physrev.00011.2008.
66. Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., and Quon, M.J. (2003). Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 45021–45026. 10.1074/jbc.M307878200.
67. Bełtowski, J. (2012). Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39, 168–178. 10.1111/j.1440-1681.2011.05623.x.
68. Jamroz-Wiśniewska, A., Gertler, A., Solomon, G., Wood, M.E., Whiteman, M., and Bełtowski, J. (2014). Leptin-Induced Endothelium-Dependent Vasorelaxation of Peripheral Arteries in Lean and Obese Rats: Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide. *PLoS One* 9, e86744. 10.1371/journal.pone.0086744.
69. Wang, R. (2012). Shared signaling pathways among gasotransmitters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 8801–8802. 10.1073/pnas.1206646109.
70. Lee, S.W., Cheng, Y., Moore, P.K., and Bian, J.-S. (2007). Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 1142–1147. 10.1016/j.bbrc.2007.05.063.
71. Xia, N., Horke, S., Habermeier, A., Closs, E.I., Reifenberg, G., Gericke, A., Mikhed, Y., Münzel, T., Daiber, A., Förstermann, U., et al. (2016). Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36, 78–85. 10.1161/ATVBAHA.115.306263.
72. Weston, A.H., Egner, I., Dong, Y., Porter, E.L., Heagerty, A.M., and Edwards, G. (2013). Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BK_{ca} channels and adiponectin. *Br J Pharmacol* 169, 1500–1509. 10.1111/bph.12157.

73. Bussey, C.E., Withers, S.B., Saxton, S.N., Bodagh, N., Aldous, R.G., and Heagerty, A.M. (2018). β_3 -Adrenoceptor stimulation of perivascular adipocytes leads to increased fat cell-derived NO and vascular relaxation in small arteries. *Br J Pharmacol* 175, 3685–3698. 10.1111/bph.14433.
74. Montfort, W.R., Wales, J.A., and Weichsel, A. (2017). Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid Redox Signal* 26, 107–121. 10.1089/ars.2016.6693.
75. Ardanaz, N., and Pagano, P.J. (2006). Hydrogen Peroxide as a Paracrine Vascular Mediator: Regulation and Signaling Leading to Dysfunction. *Exp Biol Med* 231, 237–251. 10.1177/153537020623100302.
76. Xia, N., and Li, H. (2017). The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. *Br J Pharmacol* 174, 3425–3442. 10.1111/bph.13650.
77. Lee, R.M., Lu, C., Su, L.-Y., and Gao, Y.-J. (2009). Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J Hypertens* 27, 782–790. 10.1097/HJH.0b013e328324ed86.
78. Meyer, M.R., Fredette, N.C., Barton, M., and Prossnitz, E.R. (2013). Regulation of Vascular Smooth Muscle Tone by Adipose-Derived Contracting Factor. *PLoS One* 8, e79245. 10.1371/journal.pone.0079245.
79. Félétou, M., and Vanhoutte, P.M. (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291, H985–H1002. 10.1152/ajpheart.00292.2006.
80. Ahmad, A.A., Randall, M.D., and Roberts, R.E. (2017). Sex differences in the role of phospholipase A₂-dependent arachidonic acid pathway in the perivascular adipose tissue function in pigs. *J Physiol* 595, 6623–6634. 10.1113/JP274831.
81. Egan, K.M., Lawson, J.A., Fries, S., Koller, B., Rader, D.J., Smyth, E.M., and FitzGerald, G.A. (2004). COX-2-Derived Prostacyclin Confers

- Atheroprotection on Female Mice. *Science* (1979) 306, 1954–1957. 10.1126/science.1103333.
82. Chang, L., Villacorta, L., Li, R., Hamblin, M., Xu, W., Dou, C., Zhang, J., Wu, J., Zeng, R., and Chen, Y.E. (2012). Loss of Perivascular Adipose Tissue on Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- γ Deletion in Smooth Muscle Cells Impairs Intravascular Thermoregulation and Enhances Atherosclerosis. *Circulation* 126, 1067–1078. 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104489.
 83. Ayala-Lopez, N., and Watts, S.W. (2017). New actions of an old friend: perivascular adipose tissue’s adrenergic mechanisms. *Br J Pharmacol* 174, 3454–3465. 10.1111/bph.13663.
 84. Vargovic, P., Ukropec, J., Laukova, M., Cleary, S., Manz, B., Pacak, K., and Kvetnansky, R. (2011). Adipocytes as a new source of catecholamine production. *FEBS Lett* 585, 2279–2284. 10.1016/j.febslet.2011.06.001.
 85. Ayala-Lopez, N., Martini, M., Jackson, W.F., Darios, E., Burnett, R., Seitz, B., Fink, G.D., and Watts, S.W. (2014). Perivascular adipose tissue contains functional catecholamines. *Pharmacol Res Perspect* 2. 10.1002/prp2.41.
 86. Costa, R.M., Filgueira, F.P., Tostes, R.C., Carvalho, M.H.C., Akamine, E.H., and Lobato, N.S. (2016). 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. 10.1016/j.vph.2016.05.008.
 87. Poirier, P., Giles, T.D., Bray, G.A., Hong, Y., Stern, J.S., Pi-Sunyer, F.X., and Eckel, R.H. (2006). Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation* 113, 898–918. 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016.
 88. Shah, R. v., Anderson, A., Ding, J., Budoff, M., Rider, O., Petersen, S.E., Jensen, M.K., Koch, M., Allison, M., Kawel-Boehm, N., et al. (2017). Pericardial, But Not Hepatic, Fat by CT Is Associated With CV Outcomes

- and Structure. *JACC Cardiovasc Imaging* 10, 1016–1027. 10.1016/j.jcmg.2016.10.024.
89. Iacobellis, G. (2009). Epicardial and Pericardial Fat: Close, but Very Different. *Obesity* 17, 625–625. 10.1038/oby.2008.575.
 90. Taqueti, V.R., and di Carli, M.F. (2018). Coronary Microvascular Disease Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Options. *J Am Coll Cardiol* 72, 2625–2641. 10.1016/j.jacc.2018.09.042.
 91. Schindler, T.H., Schelbert, H.R., Quercioli, A., and Dilsizian, V. (2010). Cardiac PET Imaging for the Detection and Monitoring of Coronary Artery Disease and Microvascular Health. *JACC Cardiovasc Imaging* 3, 623–640. 10.1016/j.jcmg.2010.04.007.
 92. Quercioli, A., Montecucco, F., Pataky, Z., Thomas, A., Ambrosio, G., Staub, C., di Marzo, V., Ratib, O., Mach, F., Golay, A., et al. (2013). Improvement in coronary circulatory function in morbidly obese individuals after gastric bypass-induced weight loss: relation to alterations in endocannabinoids and adipocytokines. *Eur Heart J* 34, 2063–2073. 10.1093/eurheartj/ehs085.
 93. Gálvez-Prieto, B., Bolbrinker, J., Stucchi, P., de las Heras, A.I., Merino, B., Arribas, S., Ruiz-Gayo, M., Huber, M., Wehland, M., Kreutz, R., et al. (2008). Comparative expression analysis of the renin–angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *Journal of Endocrinology* 197, 55–64. 10.1677/JOE-07-0284.
 94. Gálvez-Prieto, B., Somoza, B., Gil-Ortega, M., García-Prieto, C.F., de las Heras, A.I., González, M.C., Arribas, S., Arangué, I., Bolbrinker, J., Kreutz, R., et al. (2012). Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. *Front Pharmacol* 3. 10.3389/fphar.2012.00103.
 95. Quesada, I., Cejas, J., García, R., Cannizzo, B., Redondo, A., and Castro, C. (2018). Vascular dysfunction elicited by a cross talk between periaortic

adipose tissue and the vascular wall is reversed by pioglitazone. *Cardiovasc Ther* 36, e12322. 10.1111/1755-5922.12322.

96. Manka, D., Chatterjee, T.K., Stoll, L.L., Basford, J.E., Konanah, E.S., Srinivasan, R., Bogdanov, V.Y., Tang, Y., Blomkalns, A.L., Hui, D.Y., et al. (2014). Transplanted Perivascular Adipose Tissue Accelerates Injury-Induced Neointimal Hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1723–1730. 10.1161/ATVBAHA.114.303983.
97. Tian, Z., Miyata, K., Tazume, H., Sakaguchi, H., Kadomatsu, T., Horio, E., Takahashi, O., Komohara, Y., Araki, K., Hirata, Y., et al. (2013). Perivascular adipose tissue-secreted angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) accelerates neointimal hyperplasia after endovascular injury. *J Mol Cell Cardiol* 57, 1–12. 10.1016/j.yjmcc.2013.01.004.
98. Viedt, C., Vogel, J., Athanasiou, T., Shen, W., Orth, S.R., Kübler, W., and Kreuzer, J. (2002). Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induces Proliferation and Interleukin-6 Production in Human Smooth Muscle Cells by Differential Activation of Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 914–920. 10.1161/01.ATV.0000019009.73586.7F.
99. Awata, W.M.C., Gonzaga, N.A., Borges, V.F., Silva, C.B.P., Tanus-Santos, J.E., Cunha, F.Q., and Tirapelli, C.R. (2019). Perivascular adipose tissue contributes to lethal sepsis-induced vasoplegia in rats. *Eur J Pharmacol* 863, 172706. 10.1016/j.ejphar.2019.172706.
100. Barp, C.G., Benedet, P.O., and Assreuy, J. (2020). Perivascular adipose tissue phenotype and sepsis vascular dysfunction: Differential contribution of NO, ROS and beta 3-adrenergic receptor. *Life Sci* 254, 117819. 10.1016/j.lfs.2020.117819.
101. Gao, Y.-J., Holloway, A.C., Zeng, Z.-H., Lim, G.E., Petrik, J.J., Foster, W.G., and Lee, R.M.K.W. (2005). Prenatal Exposure to Nicotine Causes Postnatal Obesity and Altered Perivascular Adipose Tissue Function. *Obes Res* 13, 687–692. 10.1038/oby.2005.77.

102. Withers, S.B., Forman, R., Meza-Perez, S., Sorobetea, D., Sitnik, K., Hopwood, T., Lawrence, C.B., Agace, W.W., Else, K.J., Heagerty, A.M., et al. (2017). Eosinophils are key regulators of perivascular adipose tissue and vascular functionality. *Sci Rep* 7, 44571. 10.1038/srep44571.
103. Bussey, C.E., Withers, S.B., Aldous, R.G., Edwards, G., and Heagerty, A.M. (2016). Obesity-Related Perivascular Adipose Tissue Damage Is Reversed by Sustained Weight Loss in the Rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36, 1377–1385. 10.1161/ATVBAHA.116.307210.
104. Agabiti-Rosei, C., de Ciuceis, C., Rossini, C., Porteri, E., Rodella, L.F., Withers, S.B., Heagerty, A.M., Favero, G., Agabiti-Rosei, E., Rizzoni, D., et al. (2014). Anticontractile activity of perivascular fat in obese mice and the effect of long-term treatment with melatonin. *J Hypertens* 32, 1264–1274. 10.1097/HJH.000000000000178.
105. Ketonen, J., Shi, J., Martonen, E., and Mervaala, E. (2010). Periadventitial Adipose Tissue Promotes Endothelial Dysfunction via Oxidative Stress in Diet-Induced Obese C57Bl/6 Mice. *Circulation Journal* 74, 1479–1487. 10.1253/circj.CJ-09-0661.
106. Marchesi, C., Ebrahimian, T., Angulo, O., Paradis, P., and Schiffrin, E.L. (2009). Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Perivascular Adipose Oxidative Stress and Inflammation Contribute to Vascular Dysfunction in a Rodent Model of Metabolic Syndrome. *Hypertension* 54, 1384–1392. 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138305.
107. Bełtowski, J. (2013). Endogenous hydrogen sulfide in perivascular adipose tissue: role in the regulation of vascular tone in physiology and pathology. *Can J Physiol Pharmacol* 91, 889–898. 10.1139/cjpp-2013-0001.
108. Whiteman, M., Gooding, K.M., Whatmore, J.L., Ball, C.I., Mawson, D., Skinner, K., Tooke, J.E., and Shore, A.C. (2010). Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia* 53, 1722–1726. 10.1007/s00125-010-1761-5.

109. Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R.D., Greenstein, A.S., and Heagerty, A.M. (2015). Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res* 52, 299–305. 10.1159/000443885.
110. Aghamohammadzadeh, R., Greenstein, A.S., Yadav, R., Jeziorska, M., Hama, S., Soltani, F., Pemberton, P.W., Ammori, B., Malik, R.A., Soran, H., et al. (2013). Effects of Bariatric Surgery on Human Small Artery Function. *J Am Coll Cardiol* 62, 128–135. 10.1016/j.jacc.2013.04.027.
111. Weiss, R., Dziura, J., Burgert, T.S., Tamborlane, W. v., Taksali, S.E., Yeckel, C.W., Allen, K., Lopes, M., Savoye, M., Morrison, J., et al. (2004). Obesity and the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *New England Journal of Medicine* 350, 2362–2374. 10.1056/NEJMoa031049.
112. Meijer, R.I., Bakker, W., Alta, C.-L.A.F., Sipkema, P., Yudkin, J.S., Viollet, B., Richter, E.A., Smulders, Y.M., van Hinsbergh, V.W.M., Serné, E.H., et al. (2013). Perivascular Adipose Tissue Control of Insulin-Induced Vasoreactivity in Muscle Is Impaired in db / db Mice. *Diabetes* 62, 590–598. 10.2337/db11-1603.
113. Chatterjee, T.K., Stoll, L.L., Denning, G.M., Harrelson, A., Blomkalns, A.L., Idelman, G., Rothenberg, F.G., Neltner, B., Romig-Martin, S.A., Dickson, E.W., et al. (2009). Proinflammatory Phenotype of Perivascular Adipocytes. *Circ Res* 104, 541–549. 10.1161/CIRCRESAHA.108.182998.
114. Almabrouk, T.A.M., White, A.D., Ugusman, A.B., Skiba, D.S., Katwan, O.J., Alganga, H., Guzik, T.J., Touyz, R.M., Salt, I.P., and Kennedy, S. (2018). High Fat Diet Attenuates the Anticontractile Activity of Aortic PVAT via a Mechanism Involving AMPK and Reduced Adiponectin Secretion. *Front Physiol* 9. 10.3389/fphys.2018.00051.
115. Schroeter, M.R., Eschholz, N., Herzberg, S., Jerchel, I., Leifheit-Nestler, M., Czepluch, F.S., Chalikias, G., Konstantinides, S., and Schäfer, K. (2013). Leptin-Dependent and Leptin-Independent Paracrine Effects of

Perivascular Adipose Tissue on Neointima Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 980–987. 10.1161/ATVBAHA.113.301393.

116. Korda, M., Kubant, R., Patton, S., and Malinski, T. (2008). Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295, H1514–H1521. 10.1152/ajpheart.00479.2008.
117. Hou, N., and Luo, J.-D. (2011). Leptin and cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38, 905–913. 10.1111/j.1440-1681.2011.05619.x.
118. Harlan, S.M., Morgan, D.A., Agassandian, K., Guo, D.-F., Cassell, M.D., Sigmund, C.D., Mark, A.L., and Rahmouni, K. (2011). Ablation of the Leptin Receptor in the Hypothalamic Arcuate Nucleus Abrogates Leptin-Induced Sympathetic Activation. *Circ Res* 108, 808–812. 10.1161/CIRCRESAHA.111.240226.
119. Ishikawa, Y., Ishii, T., Asuwa, N., and Masuda, S. (1997). Absence of atherosclerosis evolution in the coronary arterial segment covered by myocardial tissue in cholesterol-fed rabbits. *Virchows Archiv* 430, 163–171. 10.1007/BF01008038.
120. Madec, S., Chiarugi, M., Santini, E., Rossi, C., Miccoli, P., Ferrannini, E., and Solini, A. (2010). Pattern of expression of inflammatory markers in adipose tissue of untreated hypertensive patients. *J Hypertens* 28, 1459–1465. 10.1097/HJH.0b013e3283388871.
121. Nosalski, R., and Guzik, T.J. (2017). Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br J Pharmacol* 174, 3496–3513. 10.1111/bph.13705.
122. McLaughlin, T., Ackerman, S.E., Shen, L., and Engleman, E. (2017). Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation* 127, 5–13. 10.1172/JCI88876.
123. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage

- accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* 112, 1796–1808. 10.1172/JCI19246.
124. Withers, S.B., Forman, R., Meza-Perez, S., Sorobetea, D., Sitnik, K., Hopwood, T., Lawrence, C.B., Agace, W.W., Else, K.J., Heagerty, A.M., et al. (2017). Eosinophils are key regulators of perivascular adipose tissue and vascular functionality. *Sci Rep* 7, 44571. 10.1038/srep44571.
 125. Ferrante, A.W. (2013). The immune cells in adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* 15, 34–38. 10.1111/dom.12154.
 126. Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., and Harrison, D.G. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Journal of Experimental Medicine* 204, 2449–2460. 10.1084/jem.20070657.
 127. Winer, D.A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P.P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M.G., Alonso, M.N., et al. (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17, 610–617. 10.1038/nm.2353.
 128. Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X.D., Feng, L., Garcia, G.E., Perrard, J.L., Sweeney, J.F., Peterson, L.E., Chan, L., Smith, C.W., et al. (2007). T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. *Circulation* 115, 1029–1038. 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638379.
 129. Viridis, A., Duranti, E., Rossi, C., Dell’Agnello, U., Santini, E., Anselmino, M., Chiarugi, M., Taddei, S., and Solini, A. (2015). Tumour necrosis factor-alpha participates on the endothelin-1/nitric oxide imbalance in small arteries from obese patients: role of perivascular adipose tissue. *Eur Heart J* 36, 784–794. 10.1093/eurheartj/ehu072.
 130. Gil-Ortega, M., Stucchi, P., Guzmán-Ruiz, R., Cano, V., Arribas, S., González, M.C., Ruiz-Gayo, M., Fernández-Alfonso, M.S., and Somoza, B. (2010). Adaptive Nitric Oxide Overproduction in Perivascular Adipose Tissue

during Early Diet-Induced Obesity. *Endocrinology* 151, 3299–3306. [10.1210/en.2009-1464](https://doi.org/10.1210/en.2009-1464).

131. Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R.D., Greenstein, A.S., and Heagerty, A.M. (2015). Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res* 52, 299–305. [10.1159/000443885](https://doi.org/10.1159/000443885).
132. Xia, N., Horke, S., Habermeier, A., Closs, E.I., Reifenberg, G., Gericke, A., Mikhed, Y., Münzel, T., Daiber, A., Förstermann, U., et al. (2016). Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36, 78–85. [10.1161/ATVBAHA.115.306263](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306263).
133. Bussey, C.E., Withers, S.B., Aldous, R.G., Edwards, G., and Heagerty, A.M. (2016). Obesity-Related Perivascular Adipose Tissue Damage Is Reversed by Sustained Weight Loss in the Rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36, 1377–1385. [10.1161/ATVBAHA.116.307210](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307210).
134. Gil-Ortega, M., Condezo-Hoyos, L., García-Prieto, C.F., Arribas, S.M., González, M.C., Arangué, I., Ruiz-Gayo, M., Somoza, B., and Fernández-Alfonso, M.S. (2014). Imbalance between Pro and Anti-Oxidant Mechanisms in Perivascular Adipose Tissue Aggravates Long-Term High-Fat Diet-Derived Endothelial Dysfunction. *PLoS One* 9, e95312. [10.1371/journal.pone.0095312](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095312).
135. Weston, A.H., Egner, I., Dong, Y., Porter, E.L., Heagerty, A.M., and Edwards, G. (2013). Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BK_{ca} channels and adiponectin. *Br J Pharmacol* 169, 1500–1509. [10.1111/bph.12157](https://doi.org/10.1111/bph.12157).
136. Ozen, G., Topal, G., Gomez, I., Ghorreshi, A., Boukais, K., Benyahia, C., Kanyinda, L., Longrois, D., Teskin, O., Uydes-Dogan, B.S., et al. (2013). Control of human vascular tone by prostanoids derived from perivascular

- adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 107, 13–17. 10.1016/j.prostaglandins.2013.06.002.
137. Foudi, N., Kotelevets, L., Gomez, I., Louedec, L., Longrois, D., Chastre, E., and Norel, X. (2011). Differential reactivity of human mammary artery and saphenous vein to prostaglandin E₂ : Implication for cardiovascular grafts. *Br J Pharmacol* 163, 826–834. 10.1111/j.1476-5381.2011.01264.x.
138. Malinowski, M., Deja, M.A., Gołba, K.S., Roleder, T., Biernat, J., and Woś, S. (2008). Perivascular tissue of internal thoracic artery releases potent nitric oxide and prostacyclin-independent anticontractile factor☆. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 33, 225–231. 10.1016/j.ejcts.2007.11.007.
139. Dashwood, M.R., Dooley, A., Shi-Wen, X., Abraham, D.J., Dreifaldt, M., and Souza, D.S.R. (2011). Perivascular fat-derived leptin: a potential role in improved vein graft performance in coronary artery bypass surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 12, 170–173. 10.1510/icvts.2010.247874.
140. Dashwood, M.R., Dooley, A., Shi-Wen, X., Abraham, D.J., and Souza, D.S.R. (2007). Does Periadventitial Fat-Derived Nitric Oxide Play a Role in Improved Saphenous Vein Graft Patency in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery? *J Vasc Res* 44, 175–181. 10.1159/000099833.
141. Ford, C.A., Mong, K., and Tabrizchi, R. (2006). Influence of tangential stress on mechanical responses to vasoactive agents in human saphenous vein with and without perivascular adipose tissue. *Canadian Journal of Cardiology* 22, 1209–1216. 10.1016/S0828-282X(06)70961-8.
142. Viridis, A., Duranti, E., Rossi, C., Dell’Agnello, U., Santini, E., Anselmino, M., Chiarugi, M., Taddei, S., and Solini, A. (2015). Tumour necrosis factor-alpha participates on the endothelin-1/nitric oxide imbalance in small arteries from obese patients: role of perivascular adipose tissue. *Eur Heart J* 36, 784–794. 10.1093/eurheartj/ehu072.
143. Greenstein, A.S., Khavandi, K., Withers, S.B., Sonoyama, K., Clancy, O., Jeziorska, M., Laing, I., Yates, A.P., Pemberton, P.W., Malik, R.A., et al.

- (2009). Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation* 119, 1661–1670. 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181.
144. Aghamohammadzadeh, R., Greenstein, A.S., Yadav, R., Jeziorska, M., Hama, S., Soltani, F., Pemberton, P.W., Ammori, B., Malik, R.A., Soran, H., et al. (2013). Effects of Bariatric Surgery on Human Small Artery Function. *J Am Coll Cardiol* 62, 128–135. 10.1016/j.jacc.2013.04.027.
145. Aghamohammadzadeh, R., Greenstein, A.S., Yadav, R., Jeziorska, M., Hama, S., Soltani, F., Pemberton, P.W., Ammori, B., Malik, R.A., Soran, H., et al. (2013). Effects of Bariatric Surgery on Human Small Artery Function. *J Am Coll Cardiol* 62, 128–135. 10.1016/j.jacc.2013.04.027.
146. Greenstein, A.S., Khavandi, K., Withers, S.B., Sonoyama, K., Clancy, O., Jeziorska, M., Laing, I., Yates, A.P., Pemberton, P.W., Malik, R.A., et al. (2009). Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation* 119, 1661–1670. 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181.
147. Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R.D., Greenstein, A.S., and Heagerty, A.M. (2015). Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res* 52, 299–305. 10.1159/000443885.
148. Greenstein, A.S., Khavandi, K., Withers, S.B., Sonoyama, K., Clancy, O., Jeziorska, M., Laing, I., Yates, A.P., Pemberton, P.W., Malik, R.A., et al. (2009). Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation* 119, 1661–1670. 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181.
149. Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R.D., Greenstein, A.S., and Heagerty, A.M. (2015). Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res* 52, 299–305. 10.1159/000443885.

150. Saxton, S.N., Toms, L.K., Aldous, R.G., Withers, S.B., Ohanian, J., and Heagerty, A.M. (2021). Restoring Perivascular Adipose Tissue Function in Obesity Using Exercise. *Cardiovasc Drugs Ther* 35, 1291–1304. 10.1007/s10557-020-07136-0.
151. Liao, J., Yin, H., Huang, J., and Hu, M. (2021). Dysfunction of perivascular adipose tissue in mesenteric artery is restored by aerobic exercise in high-fat diet induced obesity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 48, 697–703. 10.1111/1440-1681.13404.
152. Bełtowski, J. (2013). Endogenous hydrogen sulfide in perivascular adipose tissue: role in the regulation of vascular tone in physiology and pathology. *Can J Physiol Pharmacol* 91, 889–898. 10.1139/cjpp-2013-0001.
153. Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Atanasova, P., Chaldakov, G.N., Chylińska-Kula, B., and Bełtowski, J. (2011). Differential effects of statins on endogenous H₂S formation in perivascular adipose tissue. *Pharmacol Res* 63, 68–76. 10.1016/j.phrs.2010.10.011.
154. Chruściel, P., Sahebkar, A., Rembek-Wieliczko, M., Serban, M.-C., Ursoniu, S., Mikhailidis, D.P., Jones, S.R., Mosteoru, S., Blaha, M.J., Martin, S.S., et al. (2016). Impact of statin therapy on plasma adiponectin concentrations: A systematic review and meta-analysis of 43 randomized controlled trial arms. *Atherosclerosis* 253, 194–208. 10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.897.
155. Agabiti-Rosei, C., de Ciuceis, C., Rossini, C., Porteri, E., Rodella, L.F., Withers, S.B., Heagerty, A.M., Favero, G., Agabiti-Rosei, E., Rizzoni, D., et al. (2014). Anticontractile activity of perivascular fat in obese mice and the effect of long-term treatment with melatonin. *J Hypertens* 32, 1264–1274. 10.1097/HJH.000000000000178.
156. Sun, Y., Li, J., Xiao, N., Wang, M., Kou, J., Qi, L., Huang, F., Liu, B., and Liu, K. (2014). Pharmacological activation of AMPK ameliorates perivascular adipose/endothelial dysfunction in a manner interdependent on AMPK and SIRT1. *Pharmacol Res* 89, 19–28. 10.1016/j.phrs.2014.07.006.

157. Chen, Y., Xu, X., Zhang, Y., Liu, K., Huang, F., Liu, B., and Kou, J. (2016). Diosgenin regulates adipokine expression in perivascular adipose tissue and ameliorates endothelial dysfunction via regulation of AMPK. *J Steroid Biochem Mol Biol* 155, 155–165. 10.1016/j.jsbmb.2015.07.005.
158. Rosei, C.A., Withers, S.B., Belcaid, L., de Ciuceis, C., Rizzoni, D., and Heagerty, A.M. (2015). Blockade of the renin–angiotensin system in small arteries and anticontractile function of perivascular adipose tissue. *J Hypertens* 33, 1039–1045. 10.1097/HJH.0000000000000506.
159. Withers, S.B., Agabiti-Rosei, C., Livingstone, D.M., Little, M.C., Aslam, R., Malik, R.A., and Heagerty, A.M. (2011). Macrophage Activation Is Responsible for Loss of Anticontractile Function in Inflamed Perivascular Fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 908–913. 10.1161/ATVBAHA.110.221705.
160. Nergårdh, A., Boréus, L.O., and Naglo, A.-S. (2009). Characterization of the Adrenergic Beta-Receptor in the Urinary Bladder of Man and Cat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 40, 14–21. 10.1111/j.1600-0773.1977.tb02049.x.
161. Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.-M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., and Strosberg, A.D. (1989). Molecular Characterization of the Human β_3 -Adrenergic Receptor. *Science* (1979) 245, 1118–1121. 10.1126/science.2570461.
162. Procino, G., Carmosino, M., Milano, S., Dal Monte, M., Schena, G., Mastrodonato, M., Gerbino, A., Bagnoli, P., and Svelto, M. (2016). β_3 adrenergic receptor in the kidney may be a new player in sympathetic regulation of renal function. *Kidney Int* 90, 555–567. 10.1016/j.kint.2016.03.020.
163. Decara, J., Rivera, P., Arrabal, S., Vargas, A., Serrano, A., Pavón, F.J., Dieguez, C., Nogueiras, R., Rodríguez de Fonseca, F., and Suárez, J. (2018). Cooperative role of the glucagon-like peptide-1 receptor and β_3 -adrenergic-mediated signalling on fat mass reduction through the

- downregulation of PKA/AKT/AMPK signalling in the adipose tissue and muscle of rats. *Acta Physiologica* 222, e13008. 10.1111/apha.13008.
164. Banfi, S., Gusarova, V., Gromada, J., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2018). Increased thermogenesis by a noncanonical pathway in ANGPTL3/8-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115. 10.1073/pnas.1717420115.
 165. Zhang, X., Hartung, J.E., Bortsov, A. v., Kim, S., O'Buckley, S.C., Kozlowski, J., and Nackley, A.G. (2018). Sustained stimulation of β 2- and β 3-adrenergic receptors leads to persistent functional pain and neuroinflammation. *Brain Behav Immun* 73, 520–532. 10.1016/j.bbi.2018.06.017.
 166. Chapple, C.R., Cardozo, L., Nitti, V.W., Siddiqui, E., and Michel, M.C. (2014). Mirabegron in overactive bladder: A review of efficacy, safety, and tolerability. *Neurourol Urodyn* 33, 17–30. 10.1002/nau.22505.
 167. GRANNEMAN, J.G.L.K.N.C.A. (1991). Molecular cloning and expression of the rat β 3-adrenergic receptor. *Molecular pharmacology*. 40, 895–899.
 168. Nahmias, C., Blin, N., Elalouf, J.M., Mattei, M.G., Strosberg, A.D., and Emorine, L.J. (1991). Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J* 10, 3721–3727. 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04940.x.
 169. Forrest, R.H., and Hickford, J.G. (2000). Rapid communication: nucleotide sequences of the bovine, caprine, and ovine beta3-adrenergic receptor genes. *J Anim Sci* 78, 1397. 10.2527/2000.7851397x.
 170. SASAKI, N., UCHIDA, E., NIIYAMA, M., YOSHIDA, T., and SAITO, M. (1998). Anti-Obesity Effects of Selective Agonists to the .BETA.3-Adrenergic Receptor in Dogs. I. The Presence of Canine .BETA.3-Adrenergic Receptor and in vivo Lipomobilization by Its Agonists. *Journal of Veterinary Medical Science* 60, 459–463. 10.1292/jvms.60.459.
 171. Jockers, R., da Silva, A., Strosberg, A.D., Bouvier, M., and Marullo, S. (1996). New Molecular and Structural Determinants Involved in β 2-Adrenergic

- Receptor Desensitization and Sequestration. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9355–9362. 10.1074/jbc.271.16.9355.
172. Nantel, F., Bonin, H., Emorine, L.J., Zilberfarb, V., Strosberg, A.D., Bouvier, M., and Marullo, S. (1993). The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol* 43, 548–555.
 173. Granneman, J.G., Lahners, K.N., and Chaudhry, A. (1993). Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol* 44, 264–270.
 174. Hutchinson, D.S., Bengtsson, T., Evans, B.A., and Summers, R.J. (2002). Mouse β_{3a} - and β_{3b} -adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells display identical pharmacology but utilize distinct signalling pathways. *Br J Pharmacol* 135, 1903–1914. 10.1038/sj.bjp.0704654.
 175. Evans, B.A., Papaioannou, M., Hamilton, S., and Summers, R.J. (1999). Alternative splicing generates two isoforms of the β_3 -adrenoceptor which are differentially expressed in mouse tissues. *Br J Pharmacol* 127, 1525–1531. 10.1038/sj.bjp.0702688.
 176. SPRONSEN, A., NAHMIAS, C., KRIEF, S., BRIEND-SUTREN, M.-M., STROSBURG, A.D., and EMORINE, L.J. (1993). The promoter and intron/exon structure of the human and mouse beta3-adrenergic-receptor genes. *Eur J Biochem* 213, 1117–1124. 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17861.x.
 177. Okeke, K., Angers, S., Bouvier, M., and Michel, M.C. (2019). Agonist-induced desensitisation of β_3 -adrenoceptors: Where, when, and how? *Br J Pharmacol* 176, 2539–2558. 10.1111/bph.14633.
 178. Milano, S., Gerbino, A., Schena, G., Carosino, M., Svelto, M., and Procino, G. (2018). Human β_3 -Adrenoreceptor is Resistant to Agonist-Induced Desensitization in Renal Epithelial Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* 48, 847–862. 10.1159/000491916.

179. Lefkowitz, R.J. (1998). G Protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18677–18680. 10.1074/jbc.273.30.18677.
180. Michel-Reher, M.B., and Michel, M.C. (2013). Agonist-induced desensitization of human β_3 -adrenoceptors expressed in human embryonic kidney cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386, 843–851. 10.1007/s00210-013-0891-y.
181. Strosberg, A.D., and Pietri-Rouxel, F. (1996). Function and regulation of the β_3 -adrenoceptor. *Trends Pharmacol Sci* 17, 373–381. 10.1016/S0165-6147(96)80011-3.
182. Baker, J.G. (2005). The selectivity of β -adrenoceptor antagonists at the human β_1 , β_2 and β_3 adrenoceptors. *Br J Pharmacol* 144, 317–322. 10.1038/sj.bjp.0706048.
183. Dessy, C., and Balligand, J.-L. (2010). Beta3-Adrenergic Receptors in Cardiac and Vascular Tissues. In, pp. 135–163. 10.1016/S1054-3589(10)59005-7.
184. Emorine, L., Blin, N., and Strosberg, A.D. (1994). The human β_3 -adrenoceptor: the search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 15, 3–7. 10.1016/0165-6147(94)90118-X.
185. Hoffmann, C., Leitz, M.R., Oberdorf-Maass, S., Lohse, M.J., and Klotz, K.-N. (2004). Comparative pharmacology of human β -adrenergic receptor subtypes? characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369, 151–159. 10.1007/s00210-003-0860-y.
186. ROZEC, B., and GAUTHIER, C. (2006). β_3 -Adrenoceptors in the cardiovascular system: Putative roles in human pathologies. *Pharmacol Ther* 111, 652–673. 10.1016/j.pharmthera.2005.12.002.
187. Perrone, M.G., Bleve, L., Santandrea, E., Vitale, P., Niso, M., and Scilimati, A. (2009). The Tertiary Amine Nitrogen Atom of Piperazine Sulfonamides as a Novel Determinant of Potent and Selective β_3 -Adrenoceptor Agonists. *ChemMedChem* 4, 2080–2097. 10.1002/cmdc.200900292.

188. Cernecka, H., Sand, C., and Michel, M.C. (2014). The Odd Sibling: Features of β_3 -Adrenoceptor Pharmacology. *Mol Pharmacol* 86, 479–484. 10.1124/mol.114.092817.
189. Grazia Perrone, M., and Scilimati, A. (2010). β_3 -Adrenoceptor Agonists and (Antagonists as) Inverse Agonists. In, pp. 197–230. 10.1016/B978-0-12-381298-8.00011-3.
190. Vrydag, W., and Michel, M.C. (2007). Tools to study β_3 -adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374, 385–398. 10.1007/s00210-006-0127-5.
191. Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., et al. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science* (1979) 347. 10.1126/science.1260419.
192. Michel, M.C., and Gravas, S. (2016). Safety and tolerability of β_3 -adrenoceptor agonists in the treatment of overactive bladder syndrome – insight from transcriptome and experimental studies. *Expert Opin Drug Saf* 15, 647–657. 10.1517/14740338.2016.1160055.
193. Takasu, T., Ukai, M., Sato, S., Matsui, T., Nagase, I., Maruyama, T., Sasamata, M., Miyata, K., Uchida, H., and Yamaguchi, O. (2007). Effect of (R)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl} Acetanilide (YM178), a Novel Selective β_3 -Adrenoceptor Agonist, on Bladder Function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321, 642–647. 10.1124/jpet.106.115840.
194. Bianchetti, A., and Manara, L. (1990). In vitro inhibition of intestinal motility by phenylethanolaminotetralines: evidence of atypical β -adrenoceptors in rat colon. *Br J Pharmacol* 100, 831–839. 10.1111/j.1476-5381.1990.tb14100.x.
195. Simiand, J., Keane, P.E., Guitard, J., Langlois, X., Gonalons, N., Martin, P., Bianchetti, A., le Fur, G., and Soubrié, P. (1992). Antidepressant profile in rodents of SR 58611A, a new selective agonist for atypical β -

- adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 219, 193–201. 10.1016/0014-2999(92)90296-G.
196. Hicks, A., McCafferty, G.P., Riedel, E., Aiyar, N., Pullen, M., Evans, C., Luce, T.D., Coatney, R.W., Rivera, G.C., Westfall, T.D., et al. (2007). GW427353 (Solabegron), a Novel, Selective β_3 -Adrenergic Receptor Agonist, Evokes Bladder Relaxation and Increases Micturition Reflex Threshold in the Dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323, 202–209. 10.1124/jpet.107.125757.
197. Ohlstein, E.H., von Keitz, A., and Michel, M.C. (2012). A Multicenter, Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial of the β_3 -Adrenoceptor Agonist Solabegron for Overactive Bladder. *Eur Urol* 62, 834–840. 10.1016/j.eururo.2012.05.053.
198. Michel, M.C., and Korstanje, C. (2016). β_3 -Adrenoceptor agonists for overactive bladder syndrome: Role of translational pharmacology in a repositioning clinical drug development project. *Pharmacol Ther* 159, 66–82. 10.1016/j.pharmthera.2016.01.007.
199. Igawa, Y., Schneider, T., Yamazaki, Y., Tatemichi, S., Homma, Y., Nishizawa, O., and Michel, M.C. (2012). Functional investigation of β -adrenoceptors in human isolated detrusor focusing on the novel selective β_3 -adrenoceptor agonist KUC-7322. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385, 759–767. 10.1007/s00210-012-0763-x.
200. Yoshida, M., Takeda, M., Gotoh, M., Nagai, S., and Kurose, T. (2018). Vibegron, a Novel Potent and Selective β_3 -Adrenoreceptor Agonist, for the Treatment of Patients with Overactive Bladder: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase 3 Study. *Eur Urol* 73, 783–790. 10.1016/j.eururo.2017.12.022.
201. Keam, S.J. (2018). Vibegron: First Global Approval. *Drugs* 78, 1835–1839. 10.1007/s40265-018-1006-3.
202. Astellas Pharma US, Inc. (2012). Mirabegron (YM178). . 202-611, August 29, 2011.

203. Otsuka, A., Shinbo, H., Matsumoto, R., Kurita, Y., and Ozono, S. (2008). Expression and functional role of β -adrenoceptors in the human urinary bladder urothelium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 473–481. 10.1007/s00210-008-0274-y.
204. Michel, M.C., and Vrydag, W. (2006). α_1 -, α_2 - and β -adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* 147, S88–S119. 10.1038/sj.bjp.0706619.
205. Yamaguchi, O. (2002). β_3 -adrenoceptors in human detrusor muscle. *Urology* 59, 25–29. 10.1016/S0090-4295(01)01635-1.
206. Wuest, M., Eichhorn, B., Grimm, M.O., Wirth, M.P., Ravens, U., and Kaumann, A.J. (2009). Catecholamines Relax Detrusor through β_2 -Adrenoceptors in Mouse and β_3 -Adrenoceptors in Man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328, 213–222. 10.1124/jpet.108.142562.
207. Takasu, T., Ukai, M., Sato, S., Matsui, T., Nagase, I., Maruyama, T., Sasamata, M., Miyata, K., Uchida, H., and Yamaguchi, O. (2007). Effect of (R)-2-(2-Aminothiazol-4-yl)-4'-{2-[(2-hydroxy-2-phenylethyl)amino]ethyl} Acetanilide (YM178), a Novel Selective β_3 -Adrenoceptor Agonist, on Bladder Function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321, 642–647. 10.1124/jpet.106.115840.
208. Iitsuka, H., van Gelderen, M., Katashima, M., Takusagawa, S., and Sawamoto, T. (2015). Pharmacokinetics of Mirabegron, a β_3 -Adrenoceptor Agonist for Treatment of Overactive Bladder, in Healthy East Asian Subjects. *Clin Ther* 37, 1031–1044. 10.1016/j.clinthera.2015.02.021.
209. Krauwinkel, W., van Dijk, J., Schaddelee, M., Eltink, C., Meijer, J., Strabach, G., van Marle, S., Kerbusch, V., and van Gelderen, M. (2012). Pharmacokinetic Properties of Mirabegron, a β_3 -Adrenoceptor Agonist: Results From Two Phase I, Randomized, Multiple-Dose Studies in Healthy Young and Elderly Men and Women. *Clin Ther* 34, 2144–2160. 10.1016/j.clinthera.2012.09.010.

210. Eltink, C., Lee, J., Schaddelee, M., Zhang, W., Kerbusch, V., Meijer, J., Marle, S. van, Grunenberg, N., Kowalski, D., Drogendijk, T., et al. (2012). Single dose pharmacokinetics and absolute bioavailability of mirabegron, a β_3 -adrenoceptor agonist for treatment of overactive bladder. *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 50, 838–850. 10.5414/CP201782.
211. Iitsuka, H., Tokuno, T., Amada, Y., Matsushima, H., Katashima, M., Sawamoto, T., Takusagawa, S., van Gelderen, M., Tanaka, T., and Miyahara, H. (2014). Pharmacokinetics of Mirabegron, a β_3 -Adrenoceptor Agonist for Treatment of Overactive Bladder, in Healthy Japanese Male Subjects: Results from Single- and Multiple-Dose Studies. *Clin Drug Investig* 34, 27–35. 10.1007/s40261-013-0146-1.
212. Lee, J., Zhang, W., Moy, S., Kowalski, D., Kerbusch, V., van Gelderen, M., Sawamoto, T., Grunenberg, N., and Keirns, J. (2013). Effects of Food Intake on the Pharmacokinetic Properties of Mirabegron Oral Controlled-Absorption System: A Single-Dose, Randomized, Crossover Study in Healthy Adults. *Clin Ther* 35, 333–341. 10.1016/j.clinthera.2013.02.014.
213. Takusagawa, S., van Lier, J.J., Suzuki, K., Nagata, M., Meijer, J., Krauwinkel, W., Schaddelee, M., Sekiguchi, M., Miyashita, A., Iwatsubo, T., et al. (2012). Absorption, Metabolism and Excretion of [14 C]Mirabegron (YM178), a Potent and Selective β_3 -Adrenoceptor Agonist, after Oral Administration to Healthy Male Volunteers. *Drug Metabolism and Disposition* 40, 815–824. 10.1124/dmd.111.043588.
214. Konishi, K., Tenmizu, D., and Takusagawa, S. (2018). Identification of Uridine 5'-Diphosphate-Glucuronosyltransferases Responsible for the Glucuronidation of Mirabegron, a Potent and Selective β_3 -Adrenoceptor Agonist, in Human Liver Microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 43, 301–309. 10.1007/s13318-017-0450-x.
215. Lee, J., Moy, S., Meijer, J., Krauwinkel, W., Sawamoto, T., Kerbusch, V., Kowalski, D., Roy, M., Marion, A., Takusagawa, S., et al. (2013). Role of Cytochrome P450 Isoenzymes 3A and 2D6 in the In Vivo Metabolism of

- Mirabegron, a β 3-Adrenoceptor Agonist. *Clin Drug Investig* 33, 429–440. 10.1007/s40261-013-0084-y.
216. Yamaguchi, O., Marui, E., Kakizaki, H., Homma, Y., Igawa, Y., Takeda, M., Nishizawa, O., Gotoh, M., Yoshida, M., Yokoyama, O., et al. (2014). Phase III, randomised, double-blind, placebo-controlled study of the β 3 - adrenoceptor agonist mirabegron, 50 mg once daily, in Japanese patients with overactive bladder. *BJU Int* 113, 951–960. 10.1111/bju.12649.
 217. Nitti, V.W., Auerbach, S., Martin, N., Calhoun, A., Lee, M., and Herschorn, S. (2013). Results of a Randomized Phase III Trial of Mirabegron in Patients with Overactive Bladder. *Journal of Urology* 189, 1388–1395. 10.1016/j.juro.2012.10.017.
 218. Kuo, H.-C., Lee, K.-S., Na, Y., Sood, R., Nakaji, S., Kubota, Y., and Kuroishi, K. (2015). Results of a randomized, double-blind, parallel-group, placebo- and active-controlled, multicenter study of mirabegron, a β 3-adrenoceptor agonist, in patients with overactive bladder in Asia. *Neurourol Urodyn* 34, 685–692.
 219. Herschorn, S., Barkin, J., Castro-Diaz, D., Frankel, J.M., Espuna-Pons, M., Gousse, A.E., Stölzel, M., Martin, N., Gunther, A., and van Kerrebroeck, P. (2013). A Phase III, Randomized, Double-blind, Parallel-group, Placebo-controlled, Multicentre Study to Assess the Efficacy and Safety of the β 3 Adrenoceptor Agonist, Mirabegron, in Patients With Symptoms of Overactive Bladder. *Urology* 82, 313–320. 10.1016/j.urology.2013.02.077.
 220. Khullar, V., Amarenco, G., Angulo, J.C., Cambroner, J., Høye, K., Milsom, I., Radziszewski, P., Rechberger, T., Boerrigter, P., Drogendijk, T., et al. (2013). Efficacy and Tolerability of Mirabegron, a β 3-Adrenoceptor Agonist, in Patients with Overactive Bladder: Results from a Randomised European–Australian Phase 3 Trial. *Eur Urol* 63, 283–295. 10.1016/j.eururo.2012.10.016.
 221. Coyne, K.S., Sexton, C.C., Irwin, D.E., Kopp, Z.S., Kelleher, C.J., and Milsom, I. (2008). The impact of overactive bladder, incontinence and other lower

- urinary tract symptoms on quality of life, work productivity, sexuality and emotional well-being in men and women: results from the EPIC study. *BJU Int* 101, 1388–1395. 10.1111/j.1464-410X.2008.07601.x.
222. Macdiarmid, S.A. (2008). Maximizing the treatment of overactive bladder in the elderly. *Rev Urol* 10, 6–13.
223. Andersson, K.-E., Sarawate, C., Kahler, K.H., Stanley, E.L., and Kulkarni, A.S. (2009). Cardiovascular morbidity, heart rates and use of antimuscarinics in patients with overactive bladder. *BJU Int* 106, 268–274. 10.1111/j.1464-410X.2009.09073.x.
224. Skeberdis, V.A., Gendviliene, V., Zablockaitė, D., Treinys, R., Macjianskienė, R., Bogdelis, A., Jurevičius, J., and Fischmeister, R. (2008). β 3-adrenergic receptor activation increases human atrial tissue contractility and stimulates the L-type Ca^{2+} current. *Journal of Clinical Investigation*. 10.1172/JCI32519.
225. Brodde, O.E., and Michel, M.C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51, 651–690.
226. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) (2012). EMEA/H/C/002388. Assessment report EMA/706651/2012.
227. US Food and Drug Administration (2012). Advisory committee briefing document. Mirabegron (YM178) for the treatment of overactive bladder. Advisory committee briefing document. Mirabegron (YM178) for the treatment of overactive bladder.
228. O'Mara, A.E., Johnson, J.W., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Fletcher, L.A., Fink, Y.A., Kapuria, D., Cassimatis, T.M., Kelsey, N., et al. (2020). Chronic mirabegron treatment increases human brown fat, HDL cholesterol, and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation* 130, 2209–2219. 10.1172/JCI131126.
229. Rosa, G.M., Ferrero, S., Nitti, V.W., Wagg, A., Saleem, T., and Chapple, C.R. (2016). Cardiovascular Safety of β 3-adrenoceptor Agonists for the

- Treatment of Patients with Overactive Bladder Syndrome. *Eur Urol* 69, 311–323. 10.1016/j.eururo.2015.09.007.
230. Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III Beta3 Agonist Treatment in Chronic Pulmonary Hypertension Secondary to Heart Failure (SPHERE-HF). Beta3 Adrenergic Agonist Treatment in Chronic Pulmonary Hypertension Secondary to Heart Failure.
 231. Henning Bundgaard, R.D. Beta 3 Agonist Treatment in Heart Failure-2 (BEAT-HF II). Beta 3 Agonist Treatment in Heart Failure-2 (BEAT-HF II).
 232. Jean-Luc Balligand, U.C. de L. Assessment of Efficacy of Mirabegron, a New beta3-adrenergic Receptor in the Prevention of Heart Failure (Beta3_LVH). Assessment of Efficacy of Mirabegron, a New beta3-adrenergic Receptor in the Prevention of Heart Failure (Beta3_LVH).
 233. Mansoura University Mirabegron for Treatment of Erectile Dysfunction in Patients With LUTS Secondary to BPH: A Randomized Study. Mirabegron for Treatment of Erectile Dysfunction in Patients With LUTS Secondary to BPH: A Randomized Study.
 234. Johns Hopkins University Mirabegron For Erectile Dysfunction. Mirabegron For Erectile Dysfunction.
 235. Anil Kapoor, St.J.H.H. Efficacy And Safety Of Combination Therapy For Treatment Of Overactive Bladder In Male Patients With Benign Prostatic Hyperplasia. Efficacy And Safety Of Combination Therapy For Treatment Of Overactive Bladder In Male Patients With Benign Prostatic Hyperplasia.
 236. Calmasini, F.B., de Oliveira, M.G., Alexandre, E.C., da Silva, F.H., da Silva, C.P.V., Candido, T.Z., Antunes, E., and Mónica, F.Z. (2017). Long-term treatment with the beta-3 adrenoceptor agonist, mirabegron ameliorates detrusor overactivity and restores cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels in obese mice. *Neurourol Urodyn* 36, 1511–1518. 10.1002/nau.23171.
 237. National Mouse Metabolic Phenotyping Center Oral Gavage Glucose Tolerance Test (O GTT).

238. Fabrizio, J., Ponti, D., Gibelli, G., Croci, T., Arcidiaco, M., Crema, F., and Manara, L. (1996). Functional evidence of atypical β_3 -adrenoceptors in the human colon using the β_3 -selective adrenoceptor antagonist, SR 59230A.
239. Park, M.-J., Lee, C.-M., and Kim, D. (2019). An easy method for the clear detection of beige fat UCP1 by Western blotting. *Adipocyte* 8, 357–361. 10.1080/21623945.2019.1693746.
240. Ikemoto, S., Takahashi, M., Tsunoda, N., Maruyama, K., Itakura, H., and Ezaki, O. (1996). High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: Differential effects of dietary oils. *Metabolism* 45, 1539–1546. 10.1016/S0026-0495(96)90185-7.
241. Kirpich, I.A., Gobejishvili, L.N., Homme, M.B., Waigel, S., Cave, M., Arteel, G., Barve, S.S., McClain, C.J., and Deaciuc, I. v. (2011). Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 22, 38–45. 10.1016/j.jnutbio.2009.11.009.
242. Daniel, H., Gholami, A.M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., Mondot, S., Lepage, P., Rothballer, M., Walker, A., et al. (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J* 8, 295–308. 10.1038/ismej.2013.155.
243. Lin, S., Thomas, T., Storlien, L., and Huang, X. (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes* 24, 639–646. 10.1038/sj.ijo.0801209.
244. Winzell, M.S., and Ahrén, B. (2004). The High-Fat Diet–Fed Mouse. *Diabetes* 53, S215–S219. 10.2337/diabetes.53.suppl_3.S215.
245. An, J., Wang, Q., Yi, S., Liu, X., Jin, H., Xu, J., Wen, G., Zhu, J., and Tuo, B. (2022). The source of the fat significantly affects the results of high-fat diet intervention. *Sci Rep* 12, 4315. 10.1038/s41598-022-08249-2.
246. Kübeck, R., Bonet-Ripoll, C., Hoffmann, C., Walker, A., Müller, V.M., Schüppel, V.L., Lagkouvardos, I., Scholz, B., Engel, K.-H., Daniel, H., et al.

- (2016). Dietary fat and gut microbiota interactions determine diet-induced obesity in mice. *Mol Metab* 5, 1162–1174. 10.1016/j.molmet.2016.10.001.
247. Arch, J.R.S., Ainsworth, A.T., Cawthorne, M.A., Piercy, V., Sennitt, M. v., Thody, V.E., Wilson, C., and Wilson, S. (1984). Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309, 163–165. 10.1038/309163a0.
248. Arch, J.R., Ainsworth, A.T., Ellis, R.D., Piercy, V., Thody, V.E., Thurlby, P.L., Wilson, C., Wilson, S., and Young, P. (1984). Treatment of obesity with thermogenic beta-adrenoceptor agonists: studies on BRL 26830A in rodents. *Int J Obes* 8 Suppl 1, 1–11.
249. Yen, T.T., McKee, M.M., and Stamm, N.B. (1984). Thermogenesis and weight control. *Int J Obes* 8 Suppl 1, 65–78.
250. Meier, M.K., Alig, L., Bürgi-Saville, M.E., and Müller, M. (1984). Phenethanolamine derivatives with calorogenic and antidiabetic qualities. *Int J Obes* 8 Suppl 1, 215–225.
251. Baskin, A.S., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Anflick-Chames, E., Cero, C., Johnson, J.W., O'Mara, A.E., Fletcher, L.A., Leitner, B.P., et al. (2018). Regulation of Human Adipose Tissue Activation, Gallbladder Size, and Bile Acid Metabolism by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Diabetes* 67, 2113–2125. 10.2337/db18-0462.
252. Arch, J.R.S. (2011). Challenges in β_3 -adrenoceptor agonist drug development. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2, 59–64. 10.1177/2042018811398517.
253. Lafontan, M., and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34, 1057–1091.
254. Nahmias, C., Blin, N., Elalouf, J.M., Mattei, M.G., Strosberg, A.D., and Emorine, L.J. (1991). Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J* 10, 3721–3727. 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04940.x.

255. Arch, J.R.S., Ainsworth, A.T., Cawthorne, M.A., Piercy, V., Sennitt, M. v., Thody, V.E., Wilson, C., and Wilson, S. (1984). Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309, 163–165. 10.1038/309163a0.
256. Krief, S., Lönnqvist, F., Raimbault, S., Baude, B., van Spronsen, A., Arner, P., Strosberg, A.D., Ricquier, D., and Emorine, L.J. (1993). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *Journal of Clinical Investigation* 91, 344–349. 10.1172/JCI116191.
257. Granneman, J.G., Lahners, K.N., and Chaudhry, A. (1993). Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol* 44, 264–270.
258. de Matteis, R., Arch, J., Petroni, M., Ferrari, D., Cinti, S., and Stock, M. (2002). Immunohistochemical identification of the β 3-adrenoceptor in intact human adipocytes and ventricular myocardium: effect of obesity and treatment with ephedrine and caffeine. *Int J Obes* 26, 1442–1450. 10.1038/sj.ijo.0802148.
259. Chamberlain, P., Jennings, K., Paul, F., Cordell, J., Berry, A., Holmes, S., Park, J., Chambers, J., Sennitt, M., Stock, M., et al. (1999). The tissue distribution of the human β 3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: Direct evidence of the β 3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle. *Int J Obes* 23, 1057–1065. 10.1038/sj.ijo.0801039.
260. Hibi, M., Oishi, S., Matsushita, M., Yoneshiro, T., Yamaguchi, T., Usui, C., Yasunaga, K., Katsuragi, Y., Kubota, K., Tanaka, S., et al. (2016). Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes* 40, 1655–1661. 10.1038/ijo.2016.124.
261. Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine* 360, 1509–1517. 10.1056/NEJMoa0810780.

262. O'Mara, A.E., Johnson, J.W., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Fletcher, L.A., Fink, Y.A., Kapuria, D., Cassimatis, T.M., Kelsey, N., et al. (2020). Chronic mirabegron treatment increases human brown fat, HDL cholesterol, and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation* 130, 2209–2219. 10.1172/JCI131126.
263. Baskin, A.S., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Anflück-Chames, E., Cero, C., Johnson, J.W., O'Mara, A.E., Fletcher, L.A., Leitner, B.P., et al. (2018). Regulation of Human Adipose Tissue Activation, Gallbladder Size, and Bile Acid Metabolism by a β_3 -Adrenergic Receptor Agonist. *Diabetes* 67, 2113–2125. 10.2337/db18-0462.
264. Fujimoto, Y., Hashimoto, O., Shindo, D., Sugiyama, M., Tomonaga, S., Murakami, M., Matsui, T., and Funaba, M. (2019). Metabolic changes in adipose tissues in response to β_3 -adrenergic receptor activation in mice. *J Cell Biochem* 120, 821–835. 10.1002/jcb.27443.
265. Cornier, M.-A., Després, J.-P., Davis, N., Grossniklaus, D.A., Klein, S., Lamarche, B., Lopez-Jimenez, F., Rao, G., St-Onge, M.-P., Towfighi, A., et al. (2011). Assessing Adiposity. *Circulation* 124, 1996–2019. 10.1161/CIR.0b013e318233bc6a.
266. Després, J.-P., and Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887. 10.1038/nature05488.
267. Ross, R., Aru, J., Freeman, J., Hudson, R., and Janssen, I. (2002). Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282, E657–E663. 10.1152/ajpendo.00469.2001.
268. Tchernof, A., and Després, J.-P. (2013). Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Rev* 93, 359–404. 10.1152/physrev.00033.2011.
269. Hung, C.-S., Lee, J.-K., Yang, C.-Y., Hsieh, H.-R., Ma, W.-Y., Lin, M.-S., Liu, P.-H., Shih, S.-R., Liou, J.-M., Chuang, L.-M., et al. (2014). Measurement of

- Visceral Fat: Should We Include Retroperitoneal Fat? PLoS One 9, e112355. 10.1371/journal.pone.0112355.
270. Ribeiro, A.J.S., Yang, X., Patel, V., Madabushi, R., and Strauss, D.G. (2019). Liver Microphysiological Systems for Predicting and Evaluating Drug Effects. *Clin Pharmacol Ther* 106, 139–147. 10.1002/cpt.1458.
271. Oh, R.C., Husted, T.R., Ali, S.M., and Pantsari, M.W. (2017). Mildly Elevated Liver Transaminase Levels: Causes and Evaluation. *Am Fam Physician* 96, 709–715.
272. Prati, D., Taioli, E., Zanella, A., Torre, E. della, Butelli, S., del Vecchio, E., Vianello, L., Zanuso, F., Mozzi, F., Milani, S., et al. (2002). Updated Definitions of Healthy Ranges for Serum Alanine Aminotransferase Levels. *Ann Intern Med* 137, 1. 10.7326/0003-4819-137-1-200207020-00006.
273. Vagvala, S.H., and O'Connor, S.D. (2018). Imaging of abnormal liver function tests. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 11, 128–134. 10.1002/cld.704.
274. Ruhl, C.E., and Everhart, J.E. (2010). Trunk Fat Is Associated With Increased Serum Levels of Alanine Aminotransferase in the United States. *Gastroenterology* 138, 1346-1356.e3. 10.1053/j.gastro.2009.12.053.
275. Malakouti, M., Kataria, A., Ali, S.K., and Schenker, S. (2017). Elevated Liver Enzymes in Asymptomatic Patients – What Should I Do? *J Clin Transl Hepatol* 5, 1–10. 10.14218/JCTH.2017.00027.
276. Li, J., Wu, H., Liu, Y., and Yang, L. (2020). High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp Anim* 69, 326–335. 10.1538/expanim.19-0148.
277. Ginsberg, H.N. (1998). LIPOPROTEIN PHYSIOLOGY. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27, 503–519. 10.1016/S0889-8529(05)70023-2.
278. Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Davidson, W.S., Fayad, Z.A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.-C., Phillips, M.C., Rader, D.J., et al. (2012). Cholesterol Efflux and Atheroprotection. *Circulation* 125, 1905–1919. 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589.

279. Trigatti, B.L. (2017). SR-B1 and PDZK1. *Curr Opin Lipidol* 28, 201–208. 10.1097/MOL.0000000000000396.
280. Rader, D.J., and Hovingh, G.K. (2014). HDL and cardiovascular disease. *The Lancet* 384, 618–625. 10.1016/S0140-6736(14)61217-4.
281. Klein-Szanto, A.J.P., and Bassi, D.E. (2019). Keep recycling going: New approaches to reduce LDL-C. *Biochem Pharmacol* 164, 336–341. 10.1016/j.bcp.2019.04.003.
282. asaman Pirahanchi, M.A.S.Sharma. (2022). Biochemistry, Lipoprotein Lipase. StatPearls. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30725725/>.
283. Sridevi Devaraj, J.R.S.I.Jialal. (2022). Biochemistry, Apolipoprotein B. StatPearls [Internet]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30844166/>.
284. Senthil K. Venugopal; McDamian Anoruo; Ishwarlal Jialal (2022). Biochemistry, Low Density Lipoprotein. StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500010/>.
285. Carr, S.S., Hooper, A.J., Sullivan, D.R., and Burnett, J.R. (2019). Non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B compared with LDL-cholesterol in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment. *Pathology* 51, 148–154. 10.1016/j.pathol.2018.11.006.
286. Negres, S., Chirita, C., Arsene, A.L., Margina, D., Morosan, E., and Zbarcea, C.E. (2017). New Potential Beta-3 Adrenergic Agonists with Beta-Phenylethylamine Structure, Synthesized for the Treatment of Dyslipidemia and Obesity. In *Adiposity - Epidemiology and Treatment Modalities* (InTech). 10.5772/65328.
287. Finlin, B.S., Memetimin, H., Zhu, B., Confides, A.L., Vekaria, H.J., el Khouli, R.H., Johnson, Z.R., Westgate, P.M., Chen, J., Morris, A.J., et al. (2020). The β 3-adrenergic receptor agonist mirabegron improves glucose homeostasis in obese humans. *Journal of Clinical Investigation* 130, 2319–2331. 10.1172/JCI134892.

288. Shi, S., Li, Y., Guo, Y., and Wang, Z. (2014). Effect of Beta-3 Adrenoceptor Stimulation on the Levels of ApoA-I, PPAR α , and PPAR γ in Apolipoprotein E-deficient Mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 64, 407–411. c.
289. Wang, Z., Li, Y., and Guo, Y. (2013). β 3-Adrenoceptor activation attenuates atherosclerotic plaque formation in ApoE $^{-/-}$ mice through lowering blood lipids and glucose. *Acta Pharmacol Sin* 34, 1156–1163. 10.1038/aps.2013.70.
290. Capurso, C., and Capurso, A. (2012). From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol* 57, 91–97. 10.1016/j.vph.2012.05.003.
291. Wang, H., and Peng, D.-Q. (2011). New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipids Health Dis* 10, 176. 10.1186/1476-511X-10-176.
292. Hao, L., Scott, S., Abbasi, M., Zu, Y., Khan, M.S.H., Yang, Y., Wu, D., Zhao, L., and Wang, S. (2019). Beneficial Metabolic Effects of Mirabegron In Vitro and in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 369, 419–427. 10.1124/jpet.118.255778.
293. Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kayahara, T., Kameya, T., Kawai, Y., Iwanaga, T., and Saito, M. (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *Journal of Clinical Investigation* 123, 3404–3408. 10.1172/JCI67803.
294. Vijgen, G.H.E.J., Bouvy, N.D., Teule, G.J.J., Brans, B., Schrauwen, P., and van Marken Lichtenbelt, W.D. (2011). Brown Adipose Tissue in Morbidly Obese Subjects. *PLoS One* 6, e17247. 10.1371/journal.pone.0017247.
295. Cypess, A.M., Weiner, L.S., Roberts-Toler, C., Elía, E.F., Kessler, S.H., Kahn, P.A., English, J., Chatman, K., Trauger, S.A., Doria, A., et al. (2015). Activation of Human Brown Adipose Tissue by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metab* 21, 33–38. 10.1016/j.cmet.2014.12.009.
296. Baskin, A.S., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Anflück-Chames, E., Cero, C., Johnson, J.W., O'Mara, A.E., Fletcher, L.A., Leitner, B.P., et al.

- (2018). Regulation of Human Adipose Tissue Activation, Gallbladder Size, and Bile Acid Metabolism by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Diabetes* 67, 2113–2125. 10.2337/db18-0462.
297. Mosser, R.E., Maulis, M.F., Moullé, V.S., Dunn, J.C., Carboneau, B.A., Arasi, K., Pappan, K., Poitout, V., and Gannon, M. (2015). High-fat diet-induced β -cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 308, E573–E582. 10.1152/ajpendo.00460.2014.
298. ter Horst, K.W., Vatner, D.F., Zhang, D., Cline, G.W., Ackermans, M.T., Nederveen, A.J., Verheij, J., Demirkiran, A., van Wagenveld, B.A., Dallinga-Thie, G.M., et al. (2021). Hepatic Insulin Resistance Is Not Pathway Selective in Humans With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes Care* 44, 489–498. 10.2337/dc20-1644.
299. Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 98, 2133–2223. 10.1152/physrev.00063.2017.
300. Arch, J.R., Ainsworth, A.T., Ellis, R.D., Piercy, V., Thody, V.E., Thurlby, P.L., Wilson, C., Wilson, S., and Young, P. (1984). Treatment of obesity with thermogenic beta-adrenoceptor agonists: studies on BRL 26830A in rodents. *Int J Obes* 8 Suppl 1, 1–11.
301. Arch, J.R., and Ainsworth, A.T. (1983). Thermogenic and antiobesity activity of a novel β -adrenoceptor agonist (BRL 26830A) in mice and rats. *Am J Clin Nutr* 38, 549–558. 10.1093/ajcn/38.4.549.
302. Hasegawa, Y., Ikeda, K., Chen, Y., Alba, D.L., Stifler, D., Shinoda, K., Hosono, T., Maretich, P., Yang, Y., Ishigaki, Y., et al. (2018). Repression of Adipose Tissue Fibrosis through a PRDM16-GTF2IRD1 Complex Improves Systemic Glucose Homeostasis. *Cell Metab* 27, 180-194.e6. 10.1016/j.cmet.2017.12.005.

303. CANNON, B., and NEDERGAARD, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 84, 277–359. 10.1152/physrev.00015.2003.
304. Hubert, H.B., Feinleib, M., McNamara, P.M., and Castelli, W.P. (1983). Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation* 67, 968–977. 10.1161/01.cir.67.5.968.
305. Dianas, P.G., Tritos, N.A., Stuber, M., Botnar, R.M., Kissinger, K. v, and Manning, W.J. (2003). Comparison of aortic elasticity determined by cardiovascular magnetic resonance imaging in obese versus lean adults. *Am J Cardiol* 91, 195–199. 10.1016/S0002-9149(02)03109-0.
306. Belz, G.G. (1995). Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther* 9, 73–83. 10.1007/BF00877747.
307. Kelly, R.P., Tunin, R., and Kass, D.A. (1992). Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle. *Circ Res* 71, 490–502. 10.1161/01.RES.71.3.490.
308. Bogren, H.G., Mohiaddin, R.H., Klipstein, R.K., Firmin, D.N., Underwood, R.S., Rees, S.R., and Longmore, D.B. (1989). The function of the aorta in ischemic heart disease: A magnetic resonance and angiographic study of aortic compliance and blood flow patterns. *Am Heart J* 118, 234–247. 10.1016/0002-8703(89)90181-6.
309. Laurent, S., Caviezel, B., Beck, L., Girerd, X., Billaud, E., Boutouyrie, P., Hoeks, A., and Safar, M. (1994). Carotid artery distensibility and distending pressure in hypertensive humans. *Hypertension* 23, 878–883. 10.1161/01.HYP.23.6.878.
310. Eren, M. (2004). Relation between aortic stiffness and left ventricular diastolic function in patients with hypertension, diabetes, or both. *Heart* 90, 37–43. 10.1136/heart.90.1.37.
311. Dart, A.M., Lacombe, F., Yeoh, J.K., Cameron, J.D., Jennings, G.L., Laufer, E., and Esmore, D.S. (1991). Aortic distensibility in patients with isolated

hypercholesterolaemia, coronary artery disease, or cardiac transplant. *The Lancet* 338, 270–273. 10.1016/0140-6736(91)90415-L.

312. Gao, Y.-J., Lu, C., Su, L.-Y., Sharma, A.M., and Lee, R.M.K.W. (2007). Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 151, 323–331. 10.1038/sj.bjp.0707228.
313. Hunter, R.A., Storm, W.L., Coneski, P.N., and Schoenfish, M.H. (2013). Inaccuracies of Nitric Oxide Measurement Methods in Biological Media. *Anal Chem* 85, 1957–1963. 10.1021/ac303787p.
314. Fulton, D., Gratton, J.-P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597–601. 10.1038/21218.
315. Garcia, V., and Sessa, W.C. (2019). Endothelial NOS: perspective and recent developments. *Br J Pharmacol* 176, 189–196. 10.1111/bph.14522.
316. Eroglu, E., Saravi, S.S.S., Sorrentino, A., Steinhorn, B., and Michel, T. (2019). Discordance between eNOS phosphorylation and activation revealed by multispectral imaging and chemogenetic methods. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 20210–20217. 10.1073/pnas.1910942116.
317. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605. 10.1038/21224.
318. Mount, P.F., Kemp, B.E., and Power, D.A. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42, 271–279. 10.1016/j.yjmcc.2006.05.023.
319. Karimi Galougahi, K., Liu, C., Garcia, A., Gentile, C., Fry, N.A., Hamilton, E.J., Hawkins, C.L., and Figtree, G.A. (2016). β 3 Adrenergic Stimulation Restores Nitric Oxide/Redox Balance and Enhances Endothelial Function in Hyperglycemia. *J Am Heart Assoc* 5. 10.1161/JAHA.115.002824.

320. Dessy, C., Moniotte, S., Ghisdal, P., Havaux, X., Noirhomme, P., and Balligand, J.L. (2004). Endothelial β_3 -Adrenoceptors Mediate Vasorelaxation of Human Coronary Microarteries Through Nitric Oxide and Endothelium-Dependent Hyperpolarization. *Circulation* 110, 948–954. 10.1161/01.CIR.0000139331.85766.AF.
321. Watts, V.L., Sepulveda, F.M., Cingolani, O.H., Ho, A.S., Niu, X., Kim, R., Miller, K.L., Vandegaer, K., Bedja, D., Gabrielson, K.L., et al. (2013). Anti-hypertrophic and anti-oxidant effect of beta3-adrenergic stimulation in myocytes requires differential neuronal NOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 62, 8–17. 10.1016/j.yjmcc.2013.04.025.
322. CANNON, B., and NEDERGAARD, J. (2004). Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev* 84, 277–359. 10.1152/physrev.00015.2003.
323. Moniotte, S., Kobzik, L., Feron, O., Trochu, J.-N., Gauthier, C., and Balligand, J.-L. (2001). Upregulation of β_3 -Adrenoceptors and Altered Contractile Response to Inotropic Amines in Human Failing Myocardium. *Circulation* 103, 1649–1655. 10.1161/01.CIR.103.12.1649.
324. Cheng, H.-J., Zhang, Z.-S., Onishi, K., Ukai, T., Sane, D.C., and Cheng, C.-P. (2001). Upregulation of Functional β_3 -Adrenergic Receptor in the Failing Canine Myocardium. *Circ Res* 89, 599–606. 10.1161/hh1901.098042.
325. Liggett, S.B., Freedman, N.J., Schwinn, D.A., and Lefkowitz, R.J. (1993). Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 3665–3669. 10.1073/pnas.90.8.3665.
326. Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109.
327. Jebelovszki, E., Kiraly, C., Erdei, N., Feher, A., Pasztor, E.T., Rutkai, I., Forster, T., Edes, I., Koller, A., and Bagi, Z. (2008). High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation. *American Journal of Physiology-Heart*

- and Circulatory Physiology 294, H2558–H2564. 10.1152/ajpheart.01198.2007.
328. Li, Z., Rodriguez-Iturbe, B., Ni, Z., Shahkarami, A., Sepassi, L., and Vaziri, N.D. (2005). Effect of hereditary obesity on renal expressions of NO synthase, caveolin-1, Akt, guanylate cyclase, and calmodulin. *Kidney Int* 68, 2766–2772. 10.1111/j.1523-1755.2005.00747.x.
329. Leiria, L.O., Silva, F.H., Davel, A.P.C., Alexandre, E.C., Calixto, M.C., de Nucci, G., Mónica, F.Z., and Antunes, E. (2014). The Soluble Guanylyl Cyclase Activator BAY 60-2770 Ameliorates Overactive Bladder in Obese Mice. *Journal of Urology* 191, 539–547. 10.1016/j.juro.2013.09.020.
330. Fujiwara, N., Osanai, T., Kamada, T., Katoh, T., Takahashi, K., and Okumura, K. (2000). Study on the Relationship Between Plasma Nitrite and Nitrate Level and Salt Sensitivity in Human Hypertension. *Circulation* 101, 856–861. 10.1161/01.CIR.101.8.856.
331. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Rassaf, T., Schindler, A., Picker, O., Scheeren, T., Gödecke, A., Schrader, J., Schulz, R., et al. (2003). Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 35, 790–796. 10.1016/S0891-5849(03)00406-4.
332. Elbaz, R., El-Assmy, A., Zahran, M.H., Hashem, A., and Shokeir, A.A. (2022). Mirabegron for treatment of erectile dysfunction concomitant with lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic obstruction: A randomized controlled trial. *International Journal of Urology* 29, 390–396. 10.1111/iju.14792.
333. Johns Hopkins University Mirabegron For Erectile Dysfunction. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02916693. <https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT02916693>.
334. Bubb, K.J., Harmer, J.A., Finemore, M., Aitken, S.J., Ali, Z.S., Billot, L., Chow, C., Golledge, J., Mister, R., Gray, M.P., et al. (2021). Protocol for the Stimulating β_3 -Adrenergic Receptors for Peripheral Artery Disease (STAR-PAD) trial: a double-blinded, randomised, placebo-controlled study

evaluating the effects of mirabegron on functional performance in patients with peripheral arterial disease. *BMJ Open* 11, e049858. 10.1136/bmjopen-2021-049858.

335. O'Mara, A.E., Johnson, J.W., Linderman, J.D., Brychta, R.J., McGehee, S., Fletcher, L.A., Fink, Y.A., Kapuria, D., Cassimatis, T.M., Kelsey, N., et al. (2020). Chronic mirabegron treatment increases human brown fat, HDL cholesterol, and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation* 130, 2209–2219. 10.1172/JCI131126.

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Efeitos do mirabegron na disfunção vascular em modelo de obesidade: ação no PVAT”*, registrado com o número do protocolo **082/2020**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), 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 de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 27 de maio de 2020.

Colaboradores: Beatriz de Souza Rodrigues
Alecsander Fabricio Moreira Bressan
Giuliana Bertozi

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/05/2020 a 10/12/2021
Espécie/Linhagem	Camundongo / C57Bl 6
Nº de animais	80
Peso/Idade	20g / 35 dias
Sexo	Macho
Origem	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2020

Prof. Dra. Katiuchia Uzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP

ANEXO B

Pharmacological Research 191 (2023) 106749



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs



Congenital diaphragmatic hernia increases the sensitivity of pulmonary arteries to nitric oxide

Alecsander F. Bressan^a, Victoria Oliveira Maia^b, Beatriz de Souza Rodrigues^a,
Giuliana Bertozzi^a, Sabrina S. Batah^b, Alexandre T. Fabro^b, Glória Pelizzo^c, Ugo Maria Pierucci^c,
Rita C. Tostes^a, Lourenço Sbragia^{d,*}, Fernando S. Carneiro^{a,*}

^a Departments of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil

^b Pathology and Legal Medicine - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil

^c Pediatric Surgery Department, "Vittore Buzzi" Children's Hospital, Milan, Italy

^d Division of Pediatric Surgery, Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Congenital diaphragmatic hernia
Pulmonary artery
NO
cGMP

ABSTRACT

Left congenital diaphragmatic hernia (CDH) can lead to pulmonary arteries abnormalities in the contralateral and ipsilateral sides of the diaphragm. Nitric oxide (NO) is the main therapy used to attenuate the vascular effects of CDH, but it is not always effective. We hypothesized that the left and right pulmonary arteries do not respond similarly to NO donors during CDH. Therefore, vasorelaxant responses of the left and right pulmonary arteries to sodium nitroprusside (SNP, a NO donor) were determined in a rabbit experimental model of left CDH. CDH was surgically induced in the fetuses of rabbits on the 25th day of pregnancy. On the 30th day of pregnancy, a midline laparotomy was performed to access the fetuses. The fetuses' left and right pulmonary arteries were isolated and mounted in myograph chambers. Vasodilation was evaluated by cumulative concentration-effect curves to SNP. Protein expression of guanylate cyclase isoforms (GC α , GC β) and the α isoform of cGMP-dependent protein kinase 1 (PKG1 α), and the concentration of NO and cGMP were determined in the pulmonary arteries. The left and right pulmonary arteries of newborns with CDH exhibited increased vasorelaxant responses to SNP (i.e. the potency of SNP was increased) compared to the control group. GC α , GC β , and PKG1 α expression were decreased, while NO and cGMP concentrations were increased in the pulmonary arteries of newborns with CDH compared to the control group. The increased cGMP mobilisation may be responsible for the increased vasorelaxant responses to the SNP in the pulmonary arteries during left CDH.

1. Introduction

Congenital diaphragmatic hernia (CDH) is a fetal abnormality that impairs the formation of the diaphragm, culminating in the translocation of organs from the abdominal cavity to the thoracic cavity [1]. The CDH prevalence is ~2.3 per 10,000 live births, according to reports from regions of North America and Europe [2–4] and the mortality varies from 20% to 40% [5]. CDH can occur bilaterally (2%), on the right (13%), or left side (85%) of the diaphragm [6,7].

Mechanical compression of the fetal lung by abdominal organs represents one factor contributing to the etiology of CDH-related

pulmonary hypoplasia [8,9]. Vascular changes can occur in the contralateral lung region of the diaphragm hernia [10,11]. The magnitude of pulmonary impairment can vary greatly among patients with CDH, especially vascular remodeling, and this reflects the variability of the patient's clinical status [12].

Pulmonary hypertension (PH) is the main secondary condition of CDH and results from pulmonary vasculature remodeling and altered vascular reactivity [13,14]. The conventional treatment for secondary PH includes inhaled nitric oxide (iNO; first-line therapy), high-frequency oscillatory ventilation (HFOV), and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) [15].

* Correspondence to: Department of Pharmacology and Division of Pediatric Surgery, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

** Correspondence to: Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail addresses: sbragia@fmrp.usp.br (L. Sbragia), fsilvac@usp.br (F.S. Carneiro).

<https://doi.org/10.1016/j.yphrs.2023.106749>

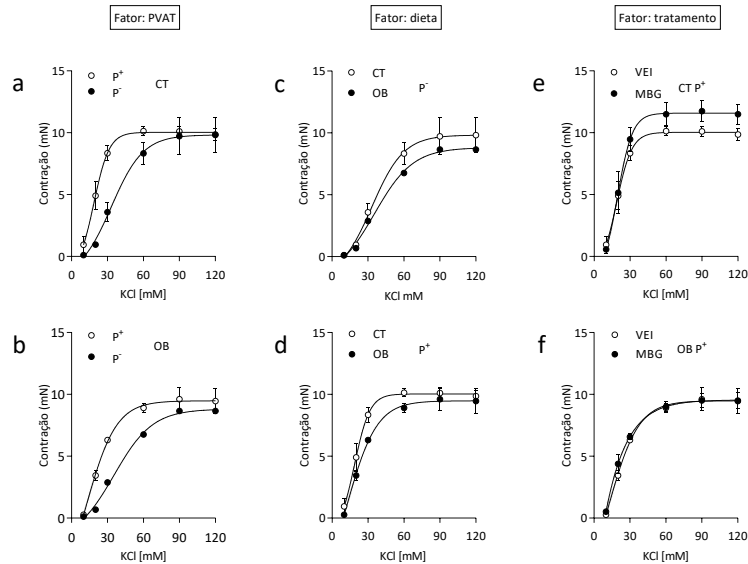
Received 3 February 2023; Received in revised form 13 March 2023; Accepted 30 March 2023

Available online 31 March 2023

1043-6618/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

APÊNDICE A

Avaliação da influência dos três fatores experimentais na resposta contrátil induzida por KCl em secções aórticas.



Avaliação da influência dos três fatores experimentais na resposta contrátil induzida por KCl. Estudo da influência do PVAT em secções aórticas dos camundongos controles (a) e obesos (b), avaliação da influência da dieta em secções aórticas com PVAT removido (c) e com PVAT preservado (d), determinação da influência do tratamento com MBG em secções aórticas com PVAT preservado dos camundongos controles (e) e obesos (f).

Justificativa

Concentrações de KCl acima de 60 mM, são utilizadas em estudos *in vitro* que avaliam a força ativa de secções arteriais isoladas, como um agente vasoconstritor, para se determinar a capacidade contrátil máxima das secções. Concentrações elevadas de KCl despolarizam a membrana das células musculares lisas vasculares, resultando na ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem e vasoconstrição. A adição temporária de KCl, no entanto, pode influenciar os resultados nesse tipo de protocolo. Altas concentrações de K^+ extracelular podem prevenir a hiperpolarização endotelial e uma resposta vasodilatadora. Além disso, a despolarização da membrana induzida por KCl pode alterar as respostas dilatadoras ou constritoras em células musculares lisas vasculares. Portanto, a mensuração aqui demonstrada teve o intuito de investigar se os fatores experimentais seriam capazes de modificar essa resposta para que se que

pudesse utilizar com segurança experimental a solução de Krebs KCl como normalizador da capacidade contrátil máxima das secções.

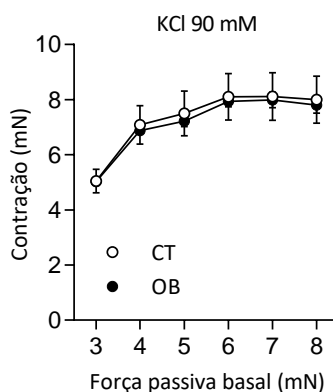
A partir desses resultados, determinou-se utilizar a solução de Krebs KCl 90 mM, como normalizador da resposta máxima contrátil das secções.

Método

Secções aórticas isoladas foram submetidas à remoção mecânica da camada endotelial e seccionadas transversalmente à 2 mm de comprimento. As secções foram montadas em miógrafo (conforme o item 3.9 deste documento), submetidas ao teste de integridade endotelial e em seguida foi registrada a resposta contrátil à adição cumulativa de KCl (10 mM a 120 mM).

APÊNDICE B

Avaliação da melhor resposta contrátil ao KCl em relação à distensão passiva aplicada.



Avaliação da melhor resposta contrátil ao KCl em relação à distensão passiva aplicada. Resposta contrátil (mN) à solução de Krebs 90 mM de secções aórticas desprovidas de PVAT.

Justificativa

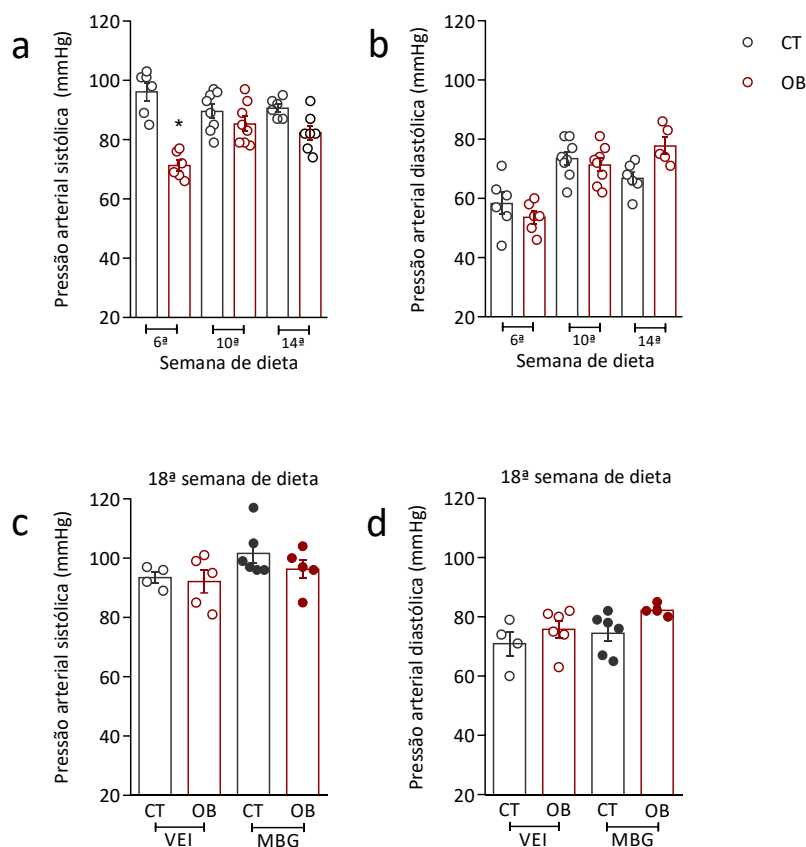
Os seguimentos arteriais produzem uma resposta ativa máxima, que é reflexo da interação entre os filamentos de actina e miosina. A interação actina-miosina nos estudos de secções arteriais *in vitro*, é ideal quando o seguimento é distendido até o ponto em que os filamentos de actina e miosina têm contato máximo, mas, com estiramento de linha de base suficiente para fornecer aptidão para contração. Considerando portanto, o uso da dieta hipercalórica e a idade dos camundongos aqui utilizados, julgou-se conveniente, determinar a melhor distensão passiva das secções a ser estudadas nesta pesquisa.

Método

Secções aórticas isoladas desprovidas de PVAT e com endotélio preservado foram seccionadas transversalmente à 2 mm de comprimento. As secções foram montadas em miógrafo (conforme método 3.9 deste documento). A distensão passiva (aplicada ao distanciar os pinos do miógrafo com micrômetro) foi aplicada nas forças de 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mN e para cada unidade de força passiva, a resposta contrátil à solução de Krebs KCl 90 mM foi registrada. A melhor força passiva basal utilizada nos estudos *in vitro* de função vascular foi de 5 mN.

APÊNDICE C

Avaliação da influência da dieta e da administração do MBG na pressão arterial sistêmica dos camundongos.



Avaliação da influência da dieta e da administração do MBG na pressão arterial sistêmica dos camundongos. Estudo da pressão arterial sistólica (a) e diastólica (b) nos períodos da 6ª, 10ª e 14ª semana de dieta nos camundongos controles e obesos. Estudo da pressão arterial sistólica (c) e diastólica (d) na 18ª semana de dieta associada ao tratamento com MBG. * $p < 0,05$.

Justificativa

As subunidades dos RA β s são importantes mediadores de sinais celulares, no conjunto de órgãos que o compõe o sistema cardiovascular, determinou-se verificar a segurança da administração do MBG em relação à pressão arterial sistêmica.

Método

A pressão arterial foi aferida pelo método de pletismografia de cauda pelo sistema CODA® (High Throughput System, Torrington, CT 06790, USA; neste sistema a

pressão diastólica é mensurada e não apenas calculada) em camundongos acordados, seguindo o protocolo de aclimatação dos camundongos à sala de procedimento (à 25°C) por 45 minutos e ao contensor individual por 3 minutos. Um termômetro infravermelho sem contato foi utilizado para aferir a temperatura caudal que devia estar entre 32°C e 35°C. A pressão máxima de oclusão caudal foi de 250 mmHg e o tempo de deflação foi 20 segundos. Os dados analisados para cada camundongo proveram de uma sessão de 10 medidas consecutivas com intervalo de 5 segundos.