

**BRUNO VINICIUS DUARTE MARQUES**

**Obesidade reduz a participação do receptor AT<sub>2</sub> na ação  
anticontrátil do tecido adiposo perivascular da aorta torácica de  
camundongos**

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

São Paulo

2019

**BRUNO VINICIUS DUARTE MARQUES**

**Obesidade reduz a participação do receptor AT<sub>2</sub> na ação  
anticontrátil do tecido adiposo perivascular da aorta torácica de  
camundongos**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliana Hiromi  
Akamine

Versão Original

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marques, Bruno Vinicius Duarte

Obesidade reduz a participação do receptor AT2 na  
ação anticontrátil do tecido adiposo perivascular da  
aorta torácica de camundongos / Bruno Vinicius  
Duarte Marques; orientadora Eliana Hiromi Akamine.  
-- São Paulo, 2019.

81 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Obesidade. 2. Reatividade vascular. 3.  
Sistema renina-angiotensina-aldosterona. 4. Tecido  
adiposo perivascular. I. Hiromi Akamine, Eliana,  
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Bruno Vinicius Duarte Marques

Título da Dissertação/Tese: Obesidade reduz a participação do receptor AT<sub>2</sub> na ação anticontrátil do tecido adiposo perivascular da aorta torácica de camundongos

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliana Hiromi Akamine

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação da sinalização do receptor AT1 dependente de beta-arrestina no tecido adiposo perivascular de camundongos obesos*", registrado sob o protocolo nº **53/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **11/04/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Eliana Hiromi Akamine**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Bruno Vinicius Duarte Marques (Pós-graduando), Renée de Nazaré Oliveira da Silva (Pós-graduando), Paula Rodrigues de Barros (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceua](http://www.icb.usp.br/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of beta-arrestin-dependent AT1 receptor signaling in perivascular adipose tissue of obese mice*", protocol nº **53/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **4/11/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Eliana Hiromi Akamine**

- Team members: *Bruno Vinicius Duarte Marques (Graduate Student), Renée de Nazaré Oliveira da Silva (Graduate Student), Paula Rodrigues de Barros (Graduate Student)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Macho/male	4 semanas/weeks	430

São Paulo, 18 de abril de 2017.

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

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento  
Secretário CEUA-ICB/USP

Este trabalho é dedicado aos meus pais e ao meu irmão  
que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir meu sonho.

E a Tata que mesmo sem estudo me ensinou  
coisas que não aprendi em nenhum outro lugar

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família que me ensinou a ser quem eu sou hoje e que guiaram com todo seu amor. E a Bela que foi minha fonte de calma durante toda essa jornada.

A minha orientadora, Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine, uma grande amiga, que me apoiou nos momentos difíceis, me ajudou a encontrar o caminho quando estive perdido e me puxou a orelha, sem nunca levantar o tom de voz ou perder o respeito. A Eli é o exemplo do que um orientador e pesquisador pode ser e que me inspira muito.

A Profa. Dra. Maria Luiza de Moraes Barreto de Chaves, que gentilmente abriu as portas do seu laboratório, que nos cedeu os animais nocaute para o receptor AT<sub>2</sub> e deu ótimas sugestões para o trabalho. A Msc. Nathalia Senger que me auxiliou no ensaio da expressão do receptor AT<sub>2</sub>, e a Marina Fevereiro que fez a criação e cuidou da colônia dos animais AT<sub>2</sub> KO, além de ajudarem com o trabalho são pessoas que tenho grande carinho.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. José Donato Junior, que disponibilizou o CLAMS e nos ajudou na análise dos resultados. A Aninha que me ensinou a utilizar o *minispec LF50* e ajudou com a manutenção dos animais no CLAMS, uma pessoa muito carinhosa que tem um coração enorme.

Ao Prof. Dr. Gerhard Malnic, por abrir o seu laboratório para que realizássemos a aferição da pressão arterial e a sua pós-doc Dra. Regiane Cardoso Castelo Branco que me ensinou a utilizar o sistema.

A Dra Maria Helena e Dra Zuleica Bruno, com quem tive pouco contato, mas que desfrutamos dos frutos do seu trabalho e paixão pela pesquisa, são duas pesquisadoras que admiro muito.

A todos os amigos do laboratório biologia vascular e laboratório de hipertensão e diabetes, principalmente à Cinthya, Renée, Van Oliveira, Andrea, que me acolheram no laboratório quando cheguei, são grandes amigas e me ensinaram diversas coisas, a Gabi Zorzi que me auxiliou muito com o acompanhamento dos animais, a Abiqueila Alves que foi e continua sendo de grande ajuda nos ensaios com os animais KO, evitando que eu pire. Ao Tiago, Paula, Van Miyoshi, Stephen, Aline e Carol, todos da sua forma ajudaram muito tanto em discussões quanto na convivência ao longo desse

período.

Não tenho palavras o suficiente para agradecer as meninas da secretaria Mone, Camila, Rosa e Laiane, todas ajudaram muito com a parte burocrática, com os meus prazos e são grandes amigas.

Gostaria de agradecer a todos os técnicos do departamento, a começar pela Bazinha e Sandra, que me ajudaram em incontáveis momentos e não somente nas questões de dentro do laboratório, são pessoas que tenho um carinho especial. Agradecer a Rosa, Moacir, Cidora, Antonio e Mari que sempre ajudaram quando precisei, além de serem ótimos amigos da hora do café.

A Gra Ceravolo, quem me orientou durante minha iniciação científica na UEL e que me trouxe para o mundo dos estudos vasculares, alguém por quem serei eternamente por ter me ajudado a despertar minha paixão pela pesquisa.

O aluno Bruno Vinicius Duarte Marques e a orientadora Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para desenvolvimento desta pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela aquisição do Equipamento Multiusuário concedido no projeto 17/02983-2: equipamento compacto de ressonância magnética minispec LF50, processo: 17/18972-0.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos na modalidade mestrando, fundamental para o desenvolvimento inicial deste estudo. Processo nº 133923 2018 5

### **Agradecimentos Especiais**

Quero separar esta seção para agradecer de forma especial algumas pessoas. Meu pai Celton, que é o meu exemplo de dedicação a família, de compromisso e de responsabilidade, sem perder a bondade e humildade. Minha mãe Ytamara, que chorou comigo nos momentos difíceis e me apoiou nos desafiadores, uma mulher que ama mais sua família do que a si mesma, emana amor no olhar e tem um abraço acolhedor. Meu irmão João Pedro, que me ensinou muito logo ao nascer, peguei no colo no seu primeiro de vida e soube que teria um grande amigo para toda a vida.



Minha avó Sonia e minha tia Simara, que são duas pessoas que sempre me incentivaram a estudar, que sempre estiveram juntamente com os meus pais no meu núcleo do que eu considero família.

Gostaria de agradecer imensamente a Tata, que cuidou de mim desde que eu nasci até entrar na faculdade, sempre me tratou como um filho e com muito amor, que mesmo sem estudos me ensinou as lições mais valiosas e que vou levar para a vida toda.

Por último mas de forma alguma menos importante, quero agradecer a Bela, minha namorada, que me ajudou nessa jornada estando comigo nos momentos mais difíceis, rindo e comemorando nos momentos bons, foi minha cobaia de treino de muitas apresentações, seu carinho e amor foram essenciais para que eu conseguisse finalizar este trabalho. Quero agradecer a sua família que me adotou como um filho, me tratando com muito carinho e confiando em mim.

*“A coisa mais importante que aprendemos na escola é o fato de que as coisas mais importantes não podem ser aprendidas na escola.”*

*(Haruki Murakami)*

## RESUMO

Marques, B. V. D. Obesidade reduz a participação do receptor  $AT_2$  na ação anticontrátil do tecido adiposo perivascular da aorta torácica de camundongos. 2019. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

A obesidade predispõe a inúmeras doenças que vem causando milhares de mortes por ano, sendo um problema de saúde pública na maior parte do mundo. Disfunção do tecido adiposo está associada ao desenvolvimento dessas doenças. O tecido adiposo perivascular (PVAT) é um depósito que está localizado circundando os vasos sanguíneos e libera diversas moléculas vasodilatadoras e vasoconstritoras, que atuam tanto no músculo liso vascular quanto no endotélio, participando do controle do tônus vascular. Assim, disfunção do PVAT pode levar ao desenvolvimento de doenças vasculares. Vários componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) estão expressos no PVAT, sendo que estes podem participar do controle do tônus vascular. O objetivo do presente projeto é avaliar o papel dos eixos vasodilatadores do SRAA (angiotensina II/receptor  $AT_2$  e enzima conversora de angiotensina 2/angiotensina 1-7/receptor Mas) na ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica de camundongos obesos. Camundongos C57Bl/6 de 4 semanas de idade foram submetidos à dieta controle (CTL) ou hiperlipídica (OB) por 16 semanas. No final deste período, foi realizada a caracterização da obesidade e avaliação da reatividade vascular de anéis de aorta torácica sem (PVAT-) e com (PVAT+) PVAT para noradrenalina, incubadas ou não com o antagonista do receptor  $AT_2$  (PD123,319), antagonista do receptor Mas (A779) e inibidor da óxido nítrico sintase (L-NAME). Nossos resultados mostram que o efeito anticontrátil do PVAT da aorta torácica está prejudicado em camundongos OB, devido a menor participação do receptor  $AT_2$ , porém essa disfunção independe de alterações da sinalização do receptor Mas e do óxido nítrico. A expressão proteica dos receptores  $AT_2$  foi reduzida na aorta e aumentada no PVAT de camundongos OB. Para confirmar a participação do receptor  $AT_2$  no efeito anticontrátil do PVAT da aorta torácica, curvas para noradrenalina foram realizadas em anéis PVAT- e PVAT+ de camundongos nocautes para esse receptor (KO), que foram alimentados com dieta controle (CTL KO) e hiperlipídica (OB KO).

Mostramos que o PVAT dos animais CTL KO não possui efeito anticontrátil e que a presença do PVAT aumenta a contração à noradrenalina em camundongos KO. Portanto, nossos resultados mostram que a presença do receptor AT<sub>2</sub> é essencial para o efeito anticontrátil do PVAT da aorta.

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

## ABSTRACT

Marques, B. V. D. Obesity reduces AT<sub>2</sub> receptor participation in anti-contractile effect of mice aortic perivascular adipose tissue. 2019. Dissertation (Master in Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019

Obesity predisposes to numerous diseases that have been causing thousands of deaths per year, being a public health problem in most of the world. Adipose tissue dysfunction is associated with the development of these diseases. Perivascular adipose tissue (PVAT) is a deposit that is located around the blood vessels and releases several vasodilator and vasoconstrictor molecules that act on both vascular smooth muscle and endothelium, participating in the control of vascular tone. Thus, PVAT dysfunction can lead to the development of vascular diseases. Several components of the renin angiotensin aldosterone system (RAAS) are expressed in PVAT, which may participate in the control of vascular tone. The aim of the present study is to evaluate the role of the RAAS vasodilator axes (angiotensin II/ AT<sub>2</sub> receptor and angiotensin converting enzyme 2/ angiotensin 1-7/ Mas receptor) in the anti-contractile action of PVAT in the thoracic aorta of obese mice. Four-week-old C57Bl/6 mice were submitted to a control (CTL) or high-fat (OB) diet for 16 weeks. At the end of this period, the characterization of obesity and assessment of vascular reactivity of thoracic aorta rings without (PVAT-) and with (PVAT+) PVAT for norepinephrine were performed in the absence and presence of AT<sub>2</sub> receptor antagonist (PD123,319), Mas receptor antagonist (A779) and nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME). Our results show that the anti-contractile effect of thoracic aortic PVAT is impaired in OB mice due to lower participation of the AT<sub>2</sub> receptor, but this dysfunction is independent of changes in Mas receptor signaling and nitric oxide. AT<sub>2</sub> receptor protein expression was reduced in the aorta and increased in the PVAT of OB mice. To confirm the participation of the AT<sub>2</sub> receptor in the anti-contractile effect of thoracic aortic PVAT, curves for norepinephrine were performed in PVAT- and PVAT+ rings from knockout mice for this receptor (KO), which were fed a control (CTL KO) and high-fat diet (OB KO). We show that the PVAT of CTL KO animals has no anti-contractile effect and that the presence of PVAT increases the norepinephrine contraction in OB KO mice.

Therefore, our results show that the presence of the AT<sub>2</sub> receptor is essential for the anti-contractile effect of aortic PVAT.

Keywords: Perivascular adipose tissue. Renin-angiotensin system. Obesity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação da genotipagem.....	28
<b>Figura 2</b> - Ganho de peso e composição corporal ao longo das 16 semanas.....	35
<b>Figura 3</b> - Massa final, índice de Lee e adiposidade.....	37
<b>Figura 4</b> - Consumo média de ração, calorias, água e eficiência energética.....	38
<b>Figura 5</b> - Consumo de oxigênio.....	39
<b>Figura 6</b> - Atividade ambulatoria voluntária.....	40
<b>Figura 7</b> - Glicemia de jejum.....	41
<b>Figura 8</b> - Pressão arterial e frequência cardíaca.....	42
<b>Figura 9</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- e PVAT+ de camundongos controles (CTL) e obesos (OB).....	44
<b>Figura 10</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta de animais controles (CTL) incubados ou não com PD 123,319.....	45
<b>Figura 11</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta de animais obesos (OB) incubados ou não com PD 123,319.....	46
<b>Figura 12</b> - Variação na área sob a curva ( $\Delta$ AUC) causada pela incubação do PD 123,319 na curva à noradrenalina.....	47
<b>Figura 13</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta de animais controles (CTL) incubados ou não com A779.....	48
<b>Figura 14</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta de animais obesos (OB) incubados ou não com A779.....	49
<b>Figura 15</b> - Variação na área sob a curva ( $\Delta$ AUC) causada pela incubação do A799 na curva à noradrenalina.....	50
<b>Figura 16</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta de animais controles (CTL) incubados ou não com L-NAME.....	51
<b>Figura 17</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta de animais obesos (OB) incubados ou não com L-NAME.....	52
<b>Figura 18</b> - Variação na área sob a curva ( $\Delta$ AUC) causada pela incubação do L-NAME na curva à noradrenalina.....	53
<b>Figura 19</b> - Expressão proteica do receptor AT <sub>2</sub> em aorta e PVAT de animais controles (CTL) e obesos (OB).....	54

<b>Figura 20</b> - Ganho de peso, consumo média de ração, calorias, água e eficiência energética dos de animais controles nocautes (CTL KO) e obesos nocautes (OB KO).....	56
<b>Figura 21</b> - Massa final, índice de Lee e adiposidade de animais controles nocautes (CTL KO) e obesos nocautes (OB KO).....	58
<b>Figura 22</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- e PVAT+ de camundongos controles nocautes (CTL KO) e obesos nocautes (OB KO).....	60



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Obesidade.....	19
1.2 Tecido adiposo perivascular.....	21
1.3 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 Delineamento experimental.....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1. Animais.....	27
3.1.1 Camundongos Geneticamente Modificado (AT2R KO).....	27
3.2 Indução da obesidade.....	28
3.3 Grupos experimentais.....	28
3.4 Caracterização.....	29
3.4.1 Ganho de massa corpórea, consumo de água, ração e calorias e adiposidade.....	29
3.4.2 Avaliação da composição corporal.....	29
3.4.3 Avaliação do metabolismo energético e atividade ambulatoria voluntária.....	30
3.4.4 Glicemia.....	30
3.4.5 Pressão arterial.....	30
3.5 Reatividade vascular.....	31
3.5.1 Protocolo experimental.....	31
3.6 Western blotting.....	32
3.7 Análise estatística.....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	34
4.1 Caracterização do modelo.....	34
4.1.1 Ganho de massa corpórea e composição corporal ao longo das 16 semanas de dieta.....	34
4.1.2 Massa corpórea final e adiposidade.....	36
4.1.3 Consumo de ração, calorias e água.....	38
4.1.4 Metabolismo energético e atividade ambulatoria voluntária.....	39
4.1.5 Glicemia.....	41

4.1.6 Pressão arterial.....	42
4.2 Avaliação da ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica de camundongos obesos.....	43
4.3 Avaliação da participação do receptor AT <sub>2</sub> na disfunção do PVAT de camundongos obesos.....	45
4.4 Avaliação da participação do receptor Mas na disfunção do PVAT de camundongos obesos.....	48
4.5 Avaliação da participação do NO na disfunção do PVAT de camundongos obesos.....	51
4.6 Expressão proteica do receptor AT <sub>2</sub> .....	54
4.7 Caracterização do modelo de obesidade nos camundongos nocautes para o receptor AT <sub>2</sub> .....	55
4.7.1 Ganho de massa, consumo de ração, calorias e água.....	55
4.7.2 Massa corpórea final e adiposidade.....	57
4.8 Avaliação da ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica de camundongos nocaute para o receptor AT <sub>2</sub> .....	59
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade é um problema de saúde pública que aumenta a predisposição a diversas doenças. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso (índice de massa corpórea, IMC,  $\geq 25$  e  $< 30$ ) e, dentre esses, aproximadamente 650 milhões estavam obesos (IMC  $\geq 30$ ), correspondendo a 39% e 13% da população acima de 18 anos, respectivamente (World Health Organization. 2017). No Brasil, 53,8% da população está acima do peso e 18,9% de brasileiros são obesos, tendo este número crescido 60% entre 2006 e 2016 (Vigitel Brasil, 2016).

Em todos os países do mundo a prevalência de obesidade vem aumentando anualmente, estima-se que a obesidade é responsável por 3,4 milhões de mortes anualmente (Ng et al., 2014). A obesidade também leva a uma diminuição da expectativa de vida da pessoa com esta condição, os números variam de acordo com o sexo e etnia, mas a quantidade de anos de vida perdidos vai de cerca de 5 até 10 anos em decorrência da obesidade (Fontaine et al., 2003; Kitahara et al., 2014; Lung et al., 2018)

Além do custo de vida, o custo econômico do sobrepeso e obesidade vem aumentando e se tornando grandes desafios das gestões públicas. No Brasil, estima-se que anualmente são gastos 2,1 bilhões de dólares com doenças relacionadas ao sobrepeso e a obesidade, sendo que 10% desse valor é atribuível somente a essas condições (Bahia et al., 2012).

Além disso, existem outros custos relacionados a essas condições, como revisado por Hammond e Levine (2010), como diminuição de produtividade, absentismo, debilidade, seguro de saúde, que somados aos gastos de saúde estima-se ter alcançado US\$ 215 bilhões.

A obesidade é usualmente consequência de um desequilíbrio entre a ingesta e gasto calórico, resultando em aumento do estoque de triglicerídeos e levando à hipertrofia do adipócito e hiperplasia do tecido adiposo. Apesar da etiologia da obesidade ser multifatorial, seu desenvolvimento parece estar mais associado a fatores comportamentais, tais como uma excessiva ingestão de alimentos com altos níveis de gorduras e carboidratos e estilo de vida sedentário, do que ao genótipo

individual (Bloor e Symonds, 2014).

Do ponto de vista da evolução, os animais evoluíram para acumular gordura quando havia comida em excesso disponível e isso significava sobrevivência nos tempos de escassez. Entretanto, devido ao fato desse acúmulo de gordura hoje ser maior do que aquele observado no nosso passado como espécie, estamos sofrendo as consequências desse acúmulo de gordura exacerbado.

Como revisado por Leal e Mafra (2013), a obesidade pode levar a diversas alterações e doenças, como resistência à insulina, inflamação, hipertensão e aterogênese, elevando o risco de doenças cardiovasculares e metabólicas. Os mecanismos envolvidos com a predisposição a essas doenças são complexos, mas se acredita que essas consequências são devidas principalmente à expansão do tecido adiposo, com hipertrofia do adipócito, que leva a hipóxia do tecido e infiltração de macrófagos. Todos esses fatores alteram a produção e liberação de adipocinas (substâncias liberadas pelo tecido adiposo), com aumento da leptina, TNF- $\alpha$ , IL-6, angiotensinogênio, entre outros, e diminuição de adiponectina.

A disfunção do tecido adiposo está associada à disfunção metabólica e a doenças cardiovasculares em indivíduos obesos (Gustafson et al., 2010; Fernandez-Sánchez, 2011; Maenhaut et al., 2011; Leal e Mafra, 2013; Fuster et al., 2016). Uma avaliação precisa das consequências da obesidade depende da avaliação da quantidade e distribuição de gordura corporal e função dos adipócitos (Haberka e Gasió, 2015; Meijer et al., 2011). Nesse sentido, o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares está mais associado à adiposidade no depósito visceral do que no depósito subcutâneo (Fitzgibbons e Czech, 2014; Wang et al., 2008). O mecanismo de aumento desse risco pode estar relacionado ao fato de que o depósito visceral é metabolicamente mais ativo do que o subcutâneo, secretando diversas substâncias vasoativas que podem contribuir para um risco cardiometabólico (Fox et al., 2007).

## 1.2 Tecido adiposo perivascular

Os vasos sanguíneos são compostos por três camadas: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. O tamanho de cada uma delas e a proporção entre elas varia conforme o leito vascular que está sendo avaliado. De forma resumida, a começar da camada mais interna, a túnica íntima é formada principalmente por uma monocamada de células endoteliais, esta camada está em direto contato com a corrente sanguínea. A túnica média é onde estão localizadas as células da musculatura lisa, que são predominantes nesta camada do vaso, e são responsáveis pela capacidade de contração e relaxamento dos vasos, além de fibras colágenas e elásticas que auxiliam na estrutura do vaso e organização das células musculares.

A adventícia, camada mais externa da parede dos vasos sanguíneos, pode ser dividida em duas subcamadas: a adventícia compacta, cujo principal tipo celular é o fibroblasto; e a gordura adventícia, que contém principalmente adipócitos (Miao e Li, 2012). A gordura adventícia é conhecida também como tecido adiposo perivascular ou PVAT. O PVAT está localizado ao redor dos vasos sanguíneos (com diâmetro acima de 100  $\mu\text{m}$ ), com exceção dos vasos sanguíneos cerebrais (Gao, 2007) e, embora as características sejam diferentes, o termo PVAT refere-se ao tecido adiposo que circunda os vasos sanguíneos independentemente da sua localização.

O PVAT é um tecido heterogêneo, com variação da sua morfologia a depender da sua localização. Fenotipicamente os adipócitos do PVAT da aorta torácica se assemelham a adipócitos marrons. Fitzgibbons e colaboradores (2011) observaram que o PVAT da aorta torácica de camundongos possui características morfológicas muito semelhantes ao tecido adiposo marrom interescapular. Dentre as características apresentadas estão a maior expressão da proteína UCP-1, grande quantidade de mitocôndrias e adipócitos multiloculares (Fitzgibbons et al., 2011). Em contrapartida, os adipócitos do PVAT das artérias mesentéricas, aorta abdominal e artérias coronárias possuem características semelhantes às de adipócitos brancos, não expressam proteína UCP-1 e são uniloculares (Chatterjee et al., 2009; Police et al., 2009; Gálvez-Prieto et al., 2012). Além de adipócitos, o PVAT possui fibroblastos, células tronco mesenquimais, células do sistema imune, terminações de neurônios e vasos sanguíneos (Eringa et al., 2012; Houben et al., 2011; Meijer et al., 2011).

Entretanto, Chang e colaboradores (2012) demonstraram que a deleção do gene do *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ), um fundamental fator

de transcrição que leva a adipogênese, condicionado à expressão da SM22 $\alpha$ , uma proteína expressa majoritariamente em células de músculo liso, leva a perda total do PVAT nesses animais, mas com desenvolvimento normal dos demais depósitos, mostrando que os precursores dos adipócitos do PVAT compartilham a mesma origem embrionária do que as células do músculo liso vascular e se diferenciam dos demais adipócitos.

Até 1991, acreditava-se que o PVAT possuía somente uma função estrutural, porém neste ano Soltis e Cassis publicaram um estudo mostrando pela primeira vez que o PVAT promovia diminuição na resposta contrátil à noradrenalina em aorta torácica de ratos e, assim, apontaram um papel do PVAT na modulação da contração vascular (Soltis e Cassis, 1991). Uma década depois, Löhn e colaboradores (2001) demonstraram que o PVAT liberava um fator relaxante não identificado, mas que levava à ativação de canais de potássio por tirosina quinases e hiperpolarização das células do músculo liso vascular. Atualmente, o PVAT é considerado um regulador negativo da vasoconstrição induzida por agonistas em condições fisiológicas. Uma vez que o PVAT libera substâncias que possuem ação autócrina e parácrina, faz com que esse depósito seja um compartimento relevante em doenças cardiometabólicas (Eringa et al., 2007; Chatterjee et al., 2009; Siegel-Axel e Häring, 2016).

O PVAT libera diversas substâncias que podem mediar sua ação anticontrátil, que podem variar com o leito vascular, a espécie e o agonista vasoconstritor avaliado. Exemplos dessas substâncias são óxido nítrico (NO) (Gao et al., 2007; Gil-Ortega et al., 2010), peróxido de hidrogênio (Gao et al., 2007), sulfeto de hidrogênio (Fang et al., 2009; Schleifenbaum et al., 2010), adiponectina (Fésüs et al., 2007), angiotensina 1-7 (Lee et al., 2009), prostaglandinas (Ozen et al., 2013) e palmitato (Lee et al., 2011). Contudo, os mecanismos que regulam a liberação dessas substâncias pelo PVAT ainda não são conhecidos. O PVAT pode liberar também fatores contráteis, pois a estimulação elétrica promove contração em artérias mesentéricas de ratos com PVAT intacto, que é prevenida por antagonistas dos receptores  $\alpha$ -adrenérgico (Soltis e Cassis, 1991) e receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II (Soltis e Cassis, 1991; Lu et al., 2010) e inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Lu et al., 2010) e NADPH oxidase (Gao et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que no PVAT a ativação dos receptores AT<sub>2</sub> e Mas levam à produção de NO e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que contribuem para o efeito anticontrátil (Nóbrega et al., 2019). Assim, os fatores

relaxantes e contráteis derivados do PVAT, associados aos fatores endoteliais, são importantes para regular o tônus vascular.

Em ratos magros, o PVAT mesentérico reduz a contração de artérias mesentéricas de maneira dependente da quantidade de gordura (Verlohren et al., 2004; Gálvez et al., 2006). Contudo, a influência do PVAT na regulação do tônus vascular pode ser alterada em condições em que ocorre disfunção do tecido adiposo. O exemplo mais ilustrativo de disfunção do tecido adiposo é a obesidade. Já foi observado que a obesidade promoveu perda do efeito anticontrátil do PVAT na aorta (Gao et al., 2005; Ma et al., 2010) e em artérias mesentéricas (Marchesi et al., 2009; Fernandez-Alfonso et al., 2013, Hashimoto, 2016), estando relacionado à diminuição de óxido nítrico, que pode ser causado tanto pela diminuição da óxido nítrico sintase (NOS) ou pelo desacoplamento da NOS.

No entanto, vale ressaltar que, devido ao fato das características morfológicas do PVAT variarem de acordo com a localização anatômica, essa perda da ação anticontrátil pode não ser universal e os mecanismos envolvidos podem variar de acordo com o leito vascular.

### 1.3 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um importante regulador da homeostasia hidroeletrólítica, da pressão arterial, de processos metabólicos e crescimento e proliferação celular de vários tecidos.

Simplificadamente, de forma sistêmica, o angiotensinogênio, principal peptídeo precursor do SRAA, produzido principalmente pelo fígado, é clivado pela renina, uma enzima produzida nas células justaglomerulares nos rins, formando a angiotensina I, um decapeptídeo, que através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) que é uma dipeptidase, é convertida à angiotensina II, um octapeptídeo, que é ligante de dois receptores, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>. O eixo formado por ECA-angiotensina II-receptor AT<sub>1</sub> é responsável por exercer as ações mais conhecidas do SRAA, entre elas estão a vasoconstrição, aumento da sede, produção de aldosterona, reabsorção de sódio, ativação do sistema nervoso simpático, hipertrofia e fibrose. Já a ativação do receptor AT<sub>2</sub> produz, na sua maior parte, efeitos que contrabalanceiam os efeitos provocados pelo receptor AT<sub>1</sub>, como vasodilatação, natriurese, prevenção da hipertrofia e fibrose vascular (Steckelings et al., 2013; Singh; Karnik, 2016)

As angiotensinas I e II podem ser clivadas pela ECA2 em angiotensina 1-9 e angiotensina 1-7, respectivamente, sendo que a angiotensina 1-9 pode ser clivada à angiotensina 1-7, que é agonista do receptor Mas. O eixo ECA2-angiotensina 1-7-receptor Mas é contrarregulador das ações da angiotensina II mediadas pelo receptor AT<sub>1</sub>. Novos membros do SRAA foram identificados nas últimas décadas. Os peptídeos que têm ações biológicas estão a angiotensina a, angiotensina III, angiotensina IV, angiotensina 3-7, angiotensina 1-12, angiotensina 1-2, angiotensina 1-3, angiotensina 1-4, angiotensina 1-5 e alamandina (Cummins, 2009; Carey, 2013; Lautner et al., 2013; Hrenak, Paulis, Simko, 2016; Moraes et al., 2017; Yu Et Al., 2016).

Todos os componentes do SRAA também são encontrados no coração, vasos sanguíneos e linfáticos, adrenais, rins, pâncreas, sistema nervoso central, sistema reprodutor e tecido adiposo, constituindo o SRAA tecidual, que funciona independentemente do SRAA sistêmico. Contudo, embora a formação de angiotensina II tecidual se dê a partir da angiotensina I, a renina local parece participar dessa conversão apenas nos rins, adrenais e cérebro, sendo que, no coração e nos vasos sanguíneos, a conversão local parece depender da renina secretada pelos rins (Nguyen Dinh Cat e Touyz, 2011). Aumento dos componentes do SRAA tecidual



ocorre independentemente da pressão arterial, na aterosclerose, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, doença renal e diabetes (Raizada et al., 2007).

Vários componentes do SRAA estão presentes no PVAT de ratos e camundongos, incluindo angiotensinogênio, ECA, ECA2, receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, receptor de renina, quimase, angiotensina I, II e 1-7 (Gálvez-Prieto et al., 2008; Inada, 2016). Foi demonstrado que tecido adiposo visceral e PVAT de humanos e camundongos produzem aldosterona de maneira dependente de angiotensina II e que o PVAT de camundongos geneticamente obesos-diabéticos promoveu disfunção endotelial em artérias mesentéricas, que foi corrigida agudamente por antagonista do receptor de mineralocorticoide (Briones et al., 2012). Estudo conduzido em nosso laboratório mostrou que o tratamento crônico com antagonista do receptor AT<sub>1</sub> losartana recuperou a ação anticontrátil do PVAT mesentérico de camundongos obesos (Hashimoto, 2016). Contudo, a participação dos eixos vasodilatadores do SRAA na ação anticontrátil do PVAT de camundongos obesos ainda não é conhecida.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo deste projeto é avaliar o papel dos eixos angiotensina II/receptor AT<sub>2</sub> e angiotensina 1-7/receptor Mas na ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica no modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica.

### **2.1 Delineamento experimental**

1. Caracterização da obesidade.
2. Avaliar a ação anticontrátil do PVAT em camundongos obesos.
3. Avaliar o papel dos eixos vasodilatadores do SRAA (angiotensina II/ AT<sub>2</sub> e ECA2/angiotensina 1-7/Mas) na ação anticontrátil do PVAT.
4. Avaliar a participação de NO na ação anticontrátil do PVAT.
5. Estudar o efeito da obesidade sobre o efeito anticontrátil de camundongos nocautes para o receptor AT<sub>2</sub>.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Camundongos machos da linhagem C57Bl/6 com 4 semanas de idade, provenientes do Biotério de Produção de Camundongos SPF da Faculdade de Medicina – Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo - foram mantidos no Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (12 h/ 12 h) tendo livre acesso à ração e água. Após o período de uma semana para aclimação os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: camundongos que receberam ração controle (CTL) e camundongos que receberam dieta hiperlipídica (OB).

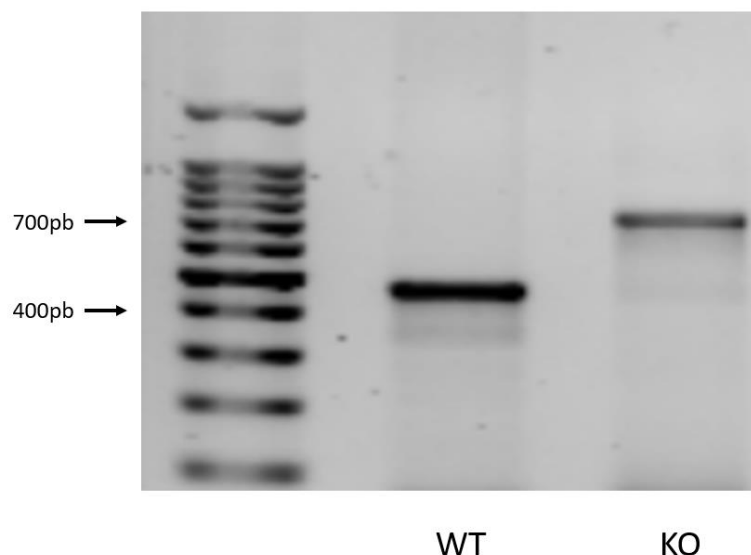
Os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foram registrados sob o protocolo nº 53/2017 e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP em 11/04/2017.

##### 3.1.1 Camundongos Geneticamente Modificado (AT<sub>2</sub>R KO)

Foram utilizados camundongos geneticamente modificados que possuem uma alteração funcional do receptor AT<sub>2</sub>, que torna o receptor funcionalmente inativo, porém tem a sua estrutura conservada (Ichiki et al., 1995), gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves do Departamento de Anatomia do ICB/ USP. Estes camundongos foram gerados no *Howard Hughes Medical Institute*, na Vanderbilt University School of Medicine, Nashville - TE, USA, a partir de camundongos C56Bl/6, e a colônia foi mantida no Biotério do Departamento de Anatomia (ICB/USP). Após completarem 5 semanas de vida, os animais foram divididos aleatoriamente naqueles que receberam ração controle (CTL-KO) e nos que receberam dieta hiperlipídica (OB-KO).

Os animais foram genotipados ao atingirem 2 semanas de vida, para verificar a presença do genótipo que resulta na falta de função do receptor AT<sub>2</sub>. A extração do DNA da de uma porção da cauda dos animais foi realizada utilizando-se o kit REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma, EUA) conforme protocolo do fabricante. Para amplificação do gene foi utilizado os seguintes primers: 5'-CCA CCA GCA GAA ACA TTA CC-3' (AT<sub>2</sub>-WT); 5'-GGC AGC GCG GCT ATC GTG G-3' (AT<sub>2</sub>-KO) e 5'-GAA

CTA CAT AAG ATG CTT GCC AGG-3' (*Antisense* comum para ambos os genótipos) (Exxtend, Brasil); e a reação em cadeia da polimerase foi realizada no termociclador (MJ- Research – PTC2000). Após a reação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose.



**Figura 1** – Imagem representativa da genotipagem dos animais nocautes (KO) para o receptor AT<sub>2</sub>.

### 3.2 Indução da obesidade

Para a indução da obesidade foi utilizada ração hiperlipídica, cujo conteúdo calórico é de 5,4 kcal/g (carboidrato, 26%; proteína, 15%; gordura, 59%) (PragSoluções, Brasil), baseado no estudo de De Souza et al. (2005). A ração controle apresenta conteúdo calórico de 3,8 kcal/g (carboidrato, 70%; proteína, 20%; gordura, 10%). Camundongos foram submetidos às dietas controle ou hiperlipídica durante 16 semanas, a partir da 5<sup>a</sup> semana de idade.

### 3.3 Grupos experimentais

- Controle (CTL): Camundongos alimentados com ração controle (N=62);
- Obeso (OB): Camundongos alimentados com ração hiperlipídica (N=62);
- Controle Nocaute (CTL-KO): Camundongos nocautes para o receptor AT<sub>2</sub> alimentados com ração controle (N=13);
- Obeso Nocaute (OB-KO): Camundongos nocautes para o receptor AT<sub>2</sub> alimentados com ração hiperlipídica (N=12);

### **3.4 Caracterização**

#### **3.4.1 Ganho de massa corpórea, consumo de água, ração e calorias e adiposidade**

Os camundongos foram pesados semanalmente e o consumo semanal médio de ração, calorias e água foi determinado ao longo das 16 semanas de tratamento com as dietas. O consumo semanal de ração, calorias e água total da caixa foi determinado e corrigido pelo número de animais. A eficiência energética foi calculada a partir do ganho de massa corpórea (g) corrigido pela energia total média ingerida (kcal) ao longo das 16 semanas de tratamento com as dietas.

A massa corpórea na 16<sup>a</sup> semana foi normalizada pelo comprimento naso-anal para determinar o índice de Lee {[massa corporal<sup>1/3</sup> (g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100}. Ao final das 16 semanas de dieta, os camundongos foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p. - Cristália, Brasil) e amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca e colocada em tubo com EDTA. Em seguida, o plasma foi obtido por centrifugação (1.500 g por 15 minutos a 4°C) e armazenado a -80°C. A massa dos depósitos de gorduras periepídimal, retroperitoneal, inguinal e interescapular foi determinada e normalizada pela massa corpórea, logo em seguida foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

#### **3.4.2 Avaliação da composição corporal**

A composição corporal foi avaliada por ressonância magnética nuclear utilizando o *Minispec LF50 Body Composition Analyzer* (Bruker, EUA). A composição corporal dos animais foi avaliada antes do início da dieta e a cada 2 semanas, os animais foram contidos em um contensor de acrílico, pesados e inseridos no equipamento para a análise, que foi feita com o animal acordado sem a necessidade de anestesia.

#### **3.4.3 Avaliação do metabolismo energético e atividade ambulatoria voluntária**

A avaliação do metabolismo e atividade ambulatoria foi feita com o uso do OxyMax/CLAMS (Comprehensive Lab Animal Monitoring System, Columbus Instruments, EUA). Os animais foram colocados em gaiolas individuais, que estão

acopladas a sensores de entrada e saída de oxigênio, sendo possível calcular, então, o consumo de oxigênio e inferir a taxa metabólica. Além disso, as caixas são equipadas com sensores que medem a posição do animal nos eixos X, Y e Z para que então seja calculada a atividade ambulatoria espontânea dos animais.

Esses cálculos dos parâmetros foram realizados pelo software Oxymax para Windows V5.02. Foram utilizados os parâmetros de consumo de oxigênio ( $VO_2$  ml/kg/h) e a atividade ambulatoria. Os animais permaneceram de 4 a 6 dias nas gaiolas individuais, sendo que foram apresentados os parâmetros dos dois últimos dias, pois os primeiros dias constituíram o tempo de ambientação ao ambiente.

#### **3.4.4 Glicemia**

Ao final da 16ª semana de dieta, o alimento foi retirado às 07 horas da manhã e, após 4 horas, a glicemia foi determinada por fitas reativas (OneTouch-Ultra) e glicosímetro (OneTouch-Lifescan) (Johnson & Johnson, EUA), utilizando-se amostras de sangue obtidas por punção caudal de animais acordados.

#### **3.4.5 Pressão arterial**

A aferição da pressão arterial foi realizada pelo método de pletismografia de cauda utilizando o sistema BP-2000 (Visitech Systems, Inc., EUA) e manguitos e contensores adequados para o tamanho dos animais, com a plataforma aquecida a 37°C. No mínimo 10 medidas válidas por cada animal foram consideradas para análise (Davel et al., 2012).

Na 15ª semana de dieta, os animais passaram por sessões de adaptação ao procedimento de aferição, uma vez ao dia, por cinco dias. No dia anterior aos animais completarem 16 semanas de dieta, a pressão sistólica foi aferida, sendo repetida no dia seguinte, e esta última medida foi considerada para a análise. As aferições da pressão foram sempre realizadas no período da manhã.

### 3.5 Reatividade vascular

Os animais foram anestesiados e antes da remoção dos depósitos de gordura, a caixa torácica foi aberta e a aorta torácica foi removida e mantida em solução nutriente de Krebs-Henseleit a 4°C (composição em mM: NaCl, 130; KCl, 4,7; NaHCO<sub>3</sub>, 14,9; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,18; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,17; EDTA, 0,026; e glicose, 5,5).

A aorta torácica foi seccionada em 4 anéis transversais de 2,0 mm. Dois anéis foram dissecados (PVAT-) e os demais permaneceram com o PVAT intacto (PVAT+). Os anéis foram montados em ganchos de 200 µm de diâmetro, fixados em cubas de miógrafos (MultWire Myograph System 620M, DMT, Dinamarca) para estudo da tensão isométrica contendo solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4, 37°C) gaseificado com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Esse miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Austrália) e este a um computador. A tensão basal foi ajustada para 9,81 mN e os anéis permaneceram nessa tensão durante 45 minutos para estabilização.

#### 3.5.1 Protocolo experimental

Após o período de estabilização, os anéis foram contraídos durante 15 minutos com a administração de cloreto de potássio (KCl, 75 mM), com a finalidade de avaliar a integridade do músculo liso e sensibilizar a preparação. Após o estímulo com KCl, os anéis foram lavados quatro vezes com solução de Krebs-Henseleit e deixados estabilizar por 30 minutos.

Após o período de estabilização, as preparações foram pré-contraídas com fenilefrina (0,1-1 µM) a fim de obter uma contração entre 50 a 70% da contração obtida com o KCl, e a integridade do endotélio foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (10 µM), vasodilatador dependente do endotélio, em induzir relaxamento em uma única aplicação, o anel sendo descartado caso o relaxamento fosse inferior a 70%. Os anéis foram lavados quatro vezes com solução de Krebs-Henseleit e, após 30 minutos de estabilização, curvas concentração-resposta para noradrenalina foram realizadas (10 pM – 30 µM).

Após a curva para noradrenalina, os anéis foram lavados quatro vezes com

solução de Krebs-Henseleit e, após 45 minutos de estabilização, as preparações foram incubadas por 20 minutos com o antagonista do receptor AT<sub>2</sub> PD 123,319 (1 µM; Sigma, EUA) ou com o antagonista do receptor Mas A779/H2888 (1 µM; Bachem, Suíça) ou com inibidor da NO sintase L-NAME (100 µM; Sigma, EUA), após o tempo de incubação foram realizadas curvas concentração-resposta para noradrenalina (10 pM – 30 µM). Após as curvas, o comprimento dos anéis foi medido com paquímetro digital.

### **3.6 Western blotting**

Assim como para realização do estudo da reatividade, a aorta torácica foi removida e mantida em solução nutriente de Krebs-Henseleit a 4°C e o PVAT foi rapidamente dissecado, a aorta e o PVAT foram secos com papel filtro e foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em -80°C.

Os tecidos mantidos a -80°C foram pulverizados em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo, homogeneizados e incubados em tampão de extração (KCl, 90 mM; Hepes, 10 mM; MgCl<sub>2</sub>, 3 mM; EDTA, 5 mM; glicerol, 1%; DTT, 1 mM; SDS, 0,04%; pH ajustado para 7,4) com a adição de mix de inibidores de proteases, por 10 minutos em gelo. Para as amostras de PVAT foi realizada uma primeira centrifugação a 3500 g, a 4°C, por 5 minutos para separação e remoção da gordura, e, então, as amostras de PVAT e aorta foram centrifugadas a 10000 g, a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para quantificação de proteínas pelo método de Bradford.

Foram então pipetadas 30 µg de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS PAGE, 10%) e submetidos à eletroforese (Bio-Rad, EUA) a 140 V por aproximadamente 2 horas, sendo que em todos os géis foi aplicado o marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad, EUA). Após a eletroforese, foi realizada a transferência para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, EUA) a 15 V por 1 hora, utilizando-se sistema semi-dry (Bio-Rad, EUA).

As membranas foram coradas com solução de Ponceau, que foi documentado e utilizado posteriormente como normalizador da quantidade de proteína carregada no gel (Romero-Calvo et al., 2010), lavadas e então incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário para receptor AT<sub>2</sub> (Santa Cruz, sc-7420) na concentração de 1:1000, diluídos em solução de BSA (1%) diluída em TTBS (Tris, 10 mM, pH 7,4; NaCl,



150 mM; Tween 20, 0,02%). Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TTBS e então incubadas com o anticorpo secundário Anti-Goat (Jackson ImmunoResearch, # 705-035-003) na concentração de 1:10000, diluídos em solução de BSA (1%) diluída em TTBS por 2 horas em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas novamente 3 vezes por 10 minutos com TTBS e então foram reveladas pelo método de quimiluminescência com incubação das membranas com o reagente Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore, EUA). A quimiluminescência foi detectada pelo fotodocumentador UVITEC (Cambridge, Reino Unido) e a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização do programa ImageJ (NIH, EUA) e expresso como unidades arbitrárias (U.A.).

### 3.7 Análise estatística

A contração das curvas concentração-resposta cumulativas à noradrenalina foi expressa como aumento da tensão ativa (mN/mm). Para cada curva concentração-resposta, a resposta máxima (Rmax) e o negativo do logaritmo de concentração capaz de produzir 50% da resposta máxima (pD2) foram calculados por análise de regressão não linear usando GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., EUA), assim como a área sob a curva (AUC). O delta da área sob a curva ( $\Delta$ AUC) foi calculado a partir da subtração da AUC da curva na presença dos antagonistas/inibidores pela AUC da curva do mesmo anel na ausência destes.

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada pelo teste “t” de *Student* não pareado ou análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do teste de comparações Bonferroni, quando pertinente. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

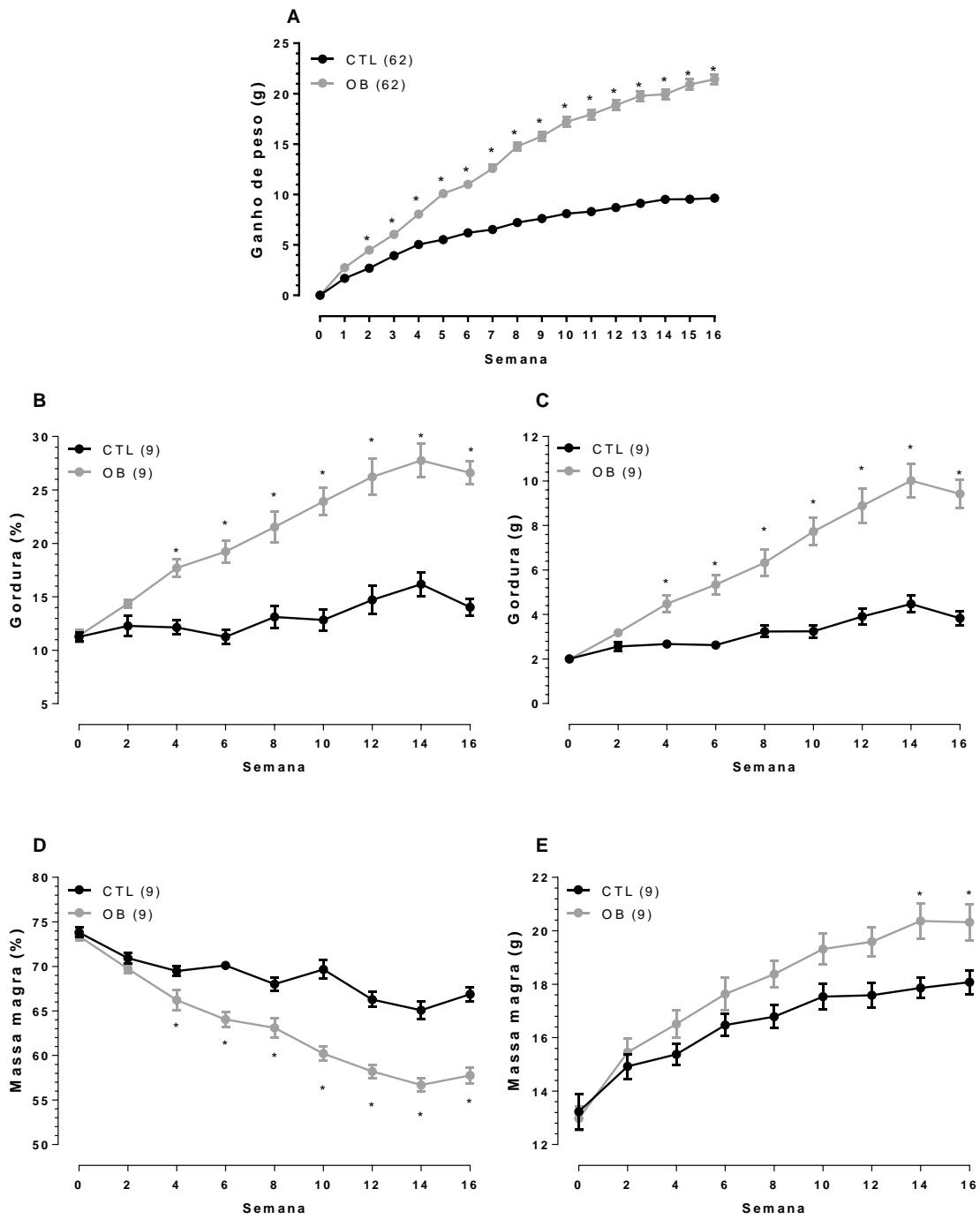
### **4.1 Caracterização do modelo**

#### **4.1.1 Ganho de massa corpórea e composição corporal ao longo das 16 semanas de dieta**

A Figura 2A mostra o ganho de massa corpórea de camundongos alimentados com ração padrão (controle) e ração hiperlipídica (obeso) ao longo de 16 semanas. Os camundongos do grupo OB passaram a apresentar maior aumento no ganho de peso em relação aos camundongos do grupo CTL a partir da 2ª semana de dieta (Figura 2A).

Com o intuito de analisar especificamente qual seria o responsável pelo o aumento no ganho de peso, então foi analisada a composição corporal. Podemos observar um aumento na gordura corporal dos camundongos do grupo OB em relação aos do grupo CTL a partir da 4ª semana de dieta, tanto quando expressa em porcentagem do peso corporal (Figura 2B), quanto a massa absoluta de gordura (Figura 2C).

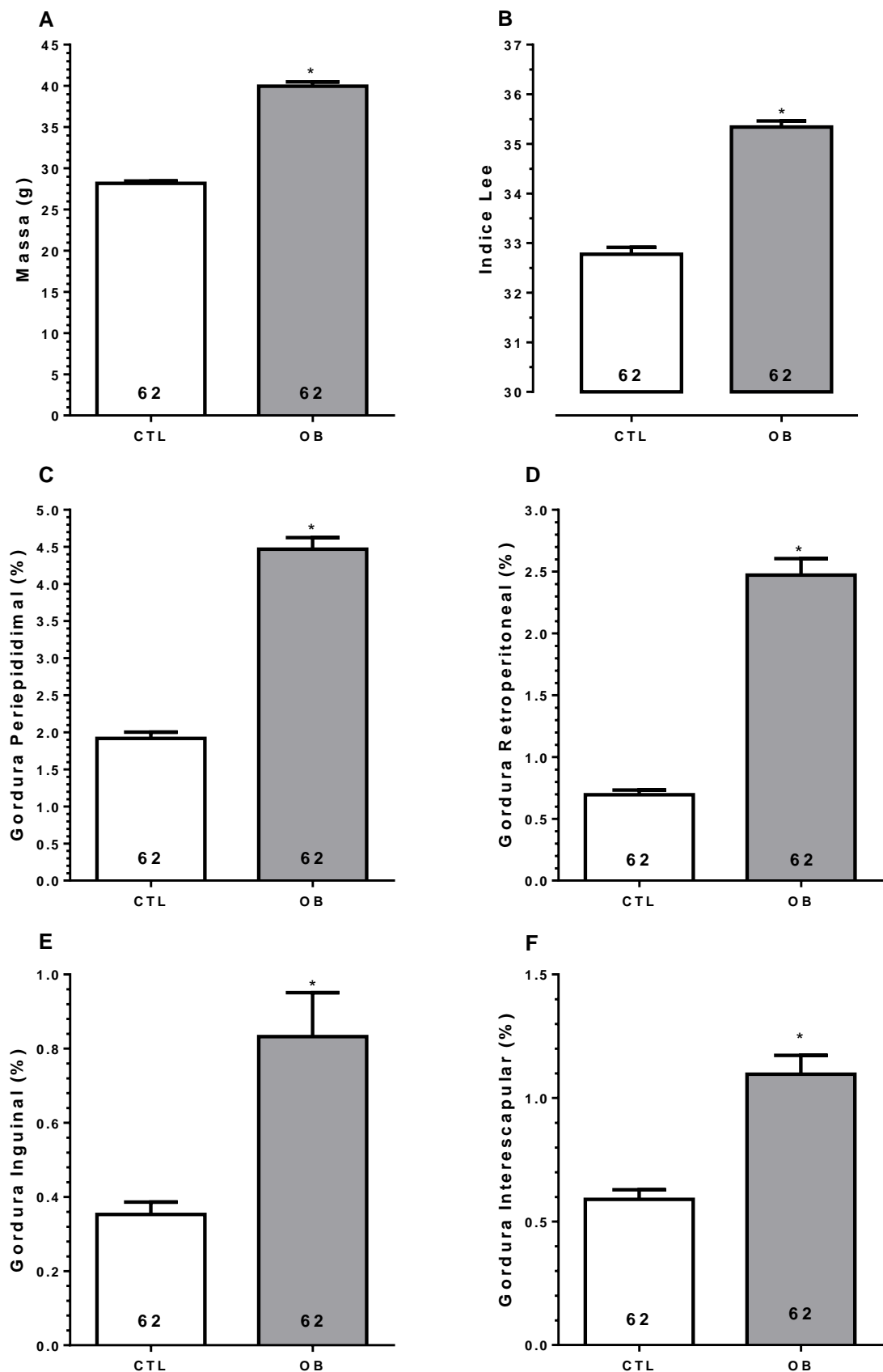
Em relação à massa magra, nós observamos uma diminuição na sua porcentagem nos camundongos do grupo OB em relação aos do grupo CTL também a partir da 4ª semana de dieta (Figura 2D). Contudo, esta diminuição da porcentagem de massa magra se deve ao fato de o aumento na massa de gordura ser mais acentuada (Figura 2C), pois, quando observamos a Figura 2E, podemos ver que ambos os grupos apresentam ganho de massa magra durante o período da dieta, sendo que a massa magra passa a ser maior nos camundongos do grupo OB em relação aos do grupo CTL a partir da 14ª semana de dieta.



**Figura 2** – Ganho de peso (A), gordura corporal em porcentagem (B) e em gramas (C) e massa magra corporal em porcentagem (D) e em gramas (E) de animais controle (CTL) e obesos (OB). Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Bonferroni, o valor entre parênteses representa o número de animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs CTL.

#### **4.1.2 Massa corpórea final e adiposidade**

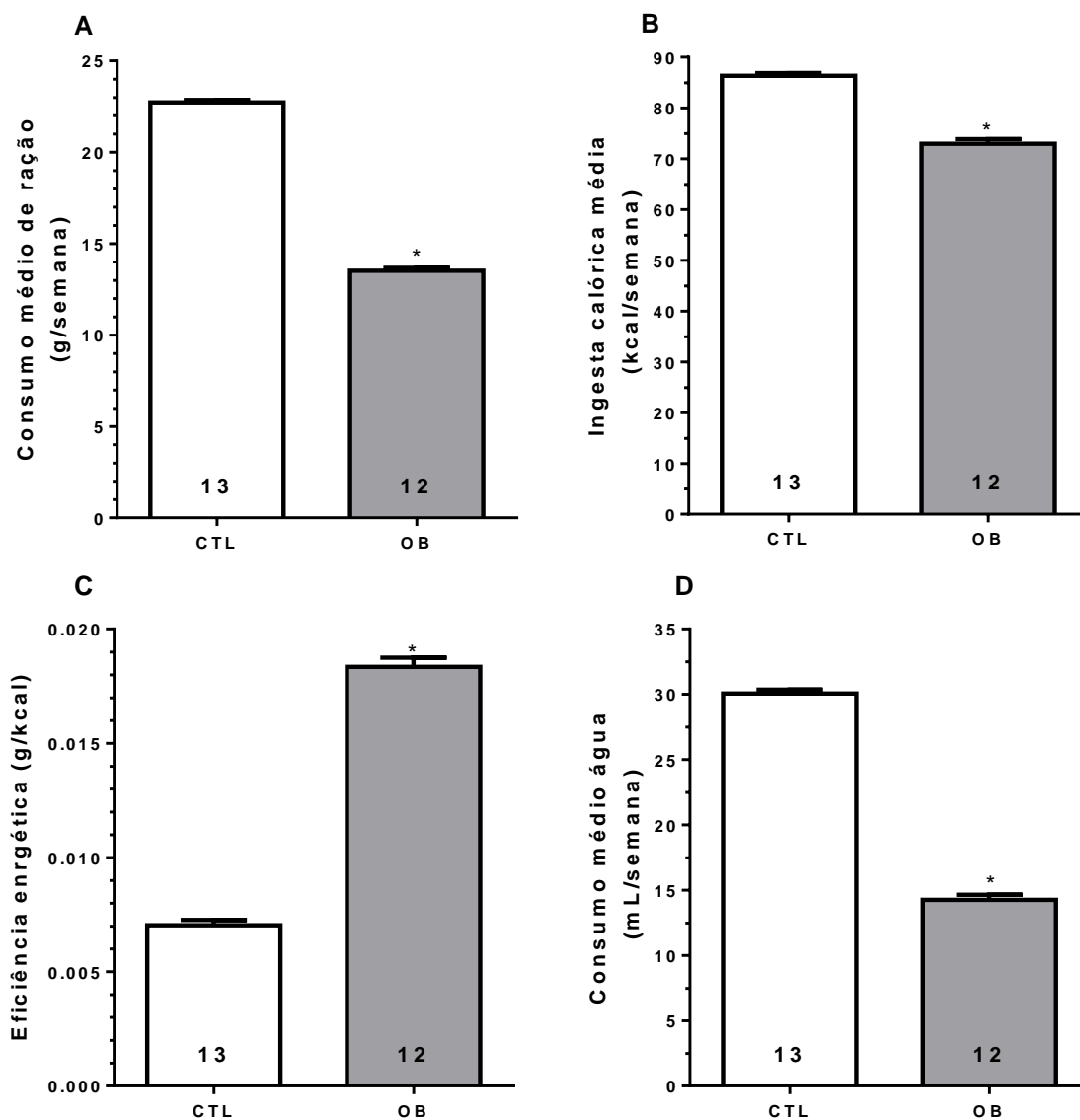
Ao final do período de 16 semanas de dieta, os camundongos do grupo OB apresentaram aumento da massa corpórea (Figura 3A) e do índice de Lee (Figura 3B), índice que normaliza a massa do animal pelo seu comprimento naso-anal, em relação aos do grupo CTL. Houve aumento em todos os depósitos de gordura avaliados, sendo eles, o depósito de gordura periepididimal (Figura 3C), retroperitoneal (Figura 3D), inguinal (Figura 3E) e interescapular (Figura 3F), de camundongos do grupo OB em relação aos do grupo CTL.



**Figura 3** – Massa corpórea final (A), índice de Lee {[massa corpórea<sup>1/3</sup> (g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100} (B), porcentagem de gordura {[massa dos depósitos de gordura (g)/ massa corpórea (g)] x 100} periepididimal (C), retroperitoneal (D), inguinal (E) e interscapular (F) de animais controle (CTL) e obesos (OB). As barras representam a média ± erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* p<0,05 vs CTL.

### 4.1.3 Consumo de ração, calorias e água

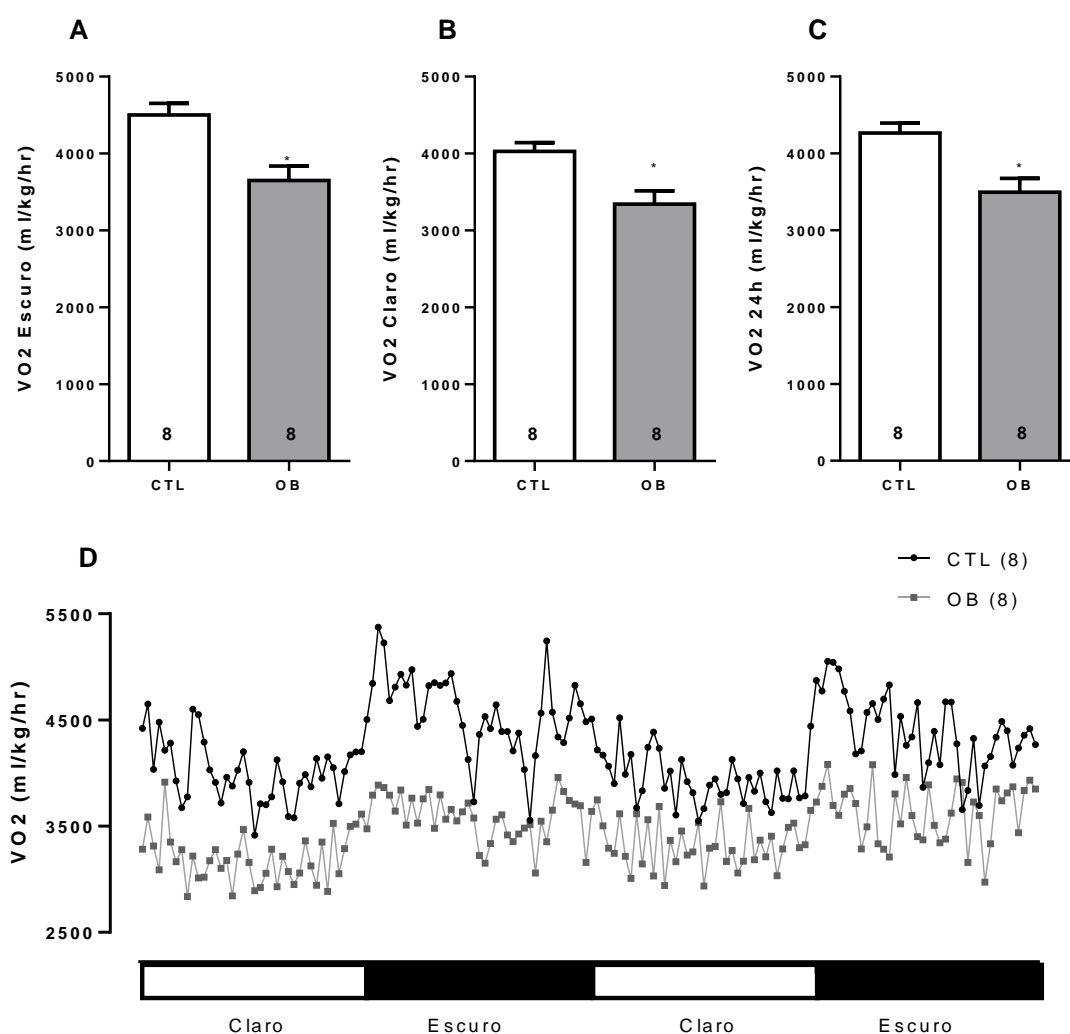
Os camundongos do grupo OB apresentaram menor consumo semanal médio de ração (Figura 4A) e de calorias (Figura 4B), porém apresentaram maior eficiência energética (Figura 4C) do que camundongos do grupo CTL. Além disso, os camundongos obesos apresentaram menor consumo de água (Figura 4D).



**Figura 4** – Consumo semanal médio de ração (A), calorias (B), eficiência energética média [ganho médio de massa corpórea (g)/ energia total ingerida (kcal)] (C) e consumo médio de água (D) de animais controle (CTL) e obesos (OB). As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de caixas avaliadas. \*  $p < 0,05$  vs CTL

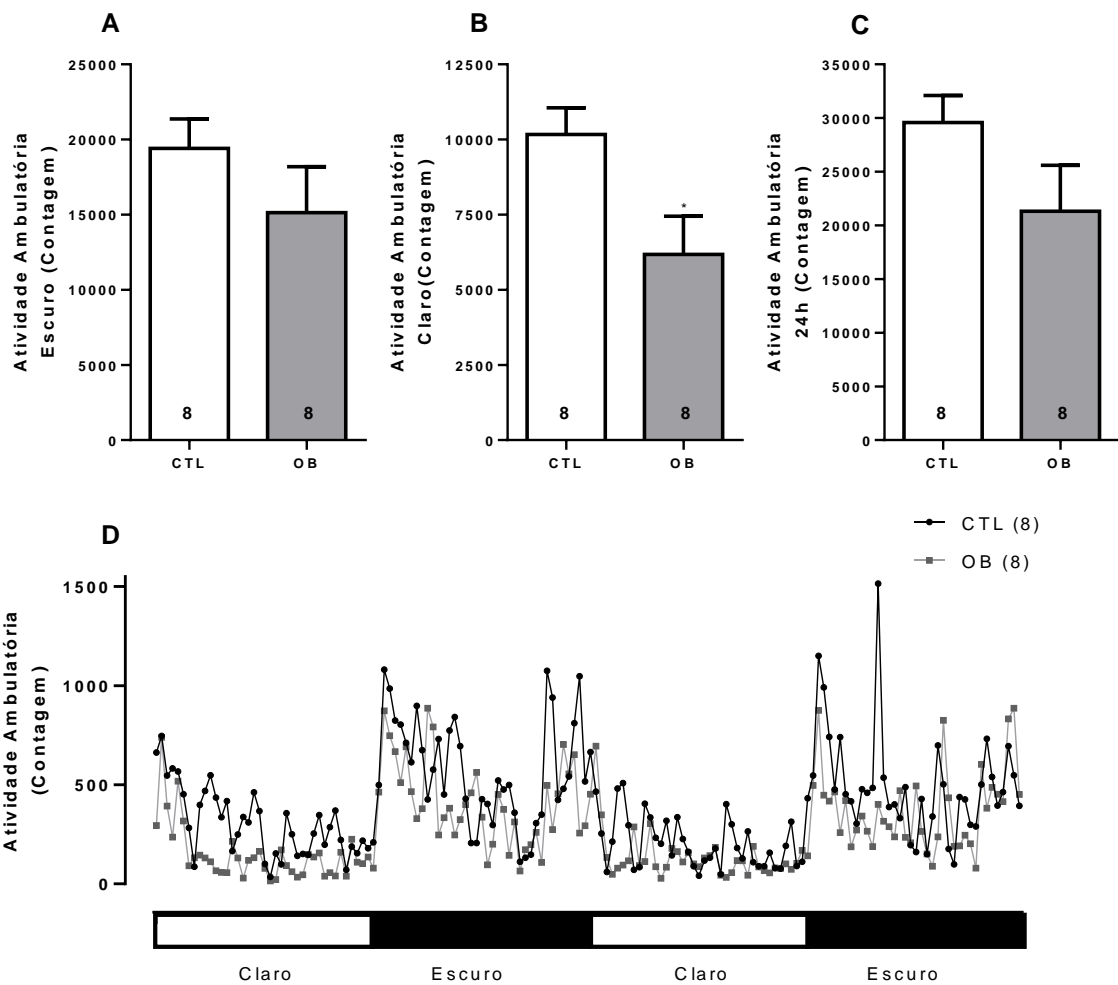
#### 4.1.4 Metabolismo energético e atividade ambulatoria voluntária

Para entendermos melhor o ganho de peso mesmo com menor consumo de calorias fomos avaliar o metabolismo energético, visto pelo consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>). Foi observado que esse parâmetro está diminuído nos camundongos do grupo OB no período escuro (Figura 5A), no período claro (Figura 5B), assim como na média das 24 horas do ciclo claro-escuro (Figura 5C), em relação aos camundongos do grupo CTL. Essas diferenças estão representadas e podem ser notadas na Figura 5D.



**Figura 5** – Consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) no período escuro (A), claro (B) e no período de 24 horas do ciclo claro-escuro (C), imagem representativa do VO<sub>2</sub> (D) de animais controle (CTL) e obesos (OB). Gráficos A, B e C: As barras representam média ± erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. Gráfico D: Cada ponto representa média, o valor entre parênteses representa o número de animais por grupo. \* p < 0,05 vs CTL.

No mesmo período em que foi analisado o consumo de oxigênio também foi avaliado a atividade ambulatoria voluntária. A atividade ambulatoria se apresentou menor nos camundongos do grupo OB em relação aos do grupo CTL somente no período claro do ciclo (Figura 6B), não sendo diferente no período escuro (Figura 6A), nem na média das 24 horas do ciclo claro-escuro (Figura 6C). A figura 6D representa a atividade ambulatoria durante todo o período em que essa foi avaliada.

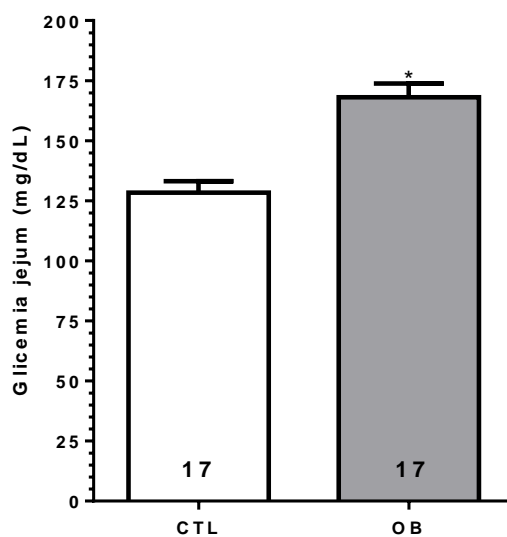


**Figura 6** – Atividade ambulatoria voluntária no período escuro (A), claro (B) e no período de 24 horas do ciclo claro-escuro (C), imagem representativa da atividade ambulatoria (D) de animais controle (CTL) e obesos (OB). Gráficos A, B e C: As barras representam média ± erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. Gráfico D: Cada ponto representa média, o valor entre parênteses representa o número de animais por grupo. \*  $p < 0,05$  vs CTL.



#### 4.1.5 Glicemia

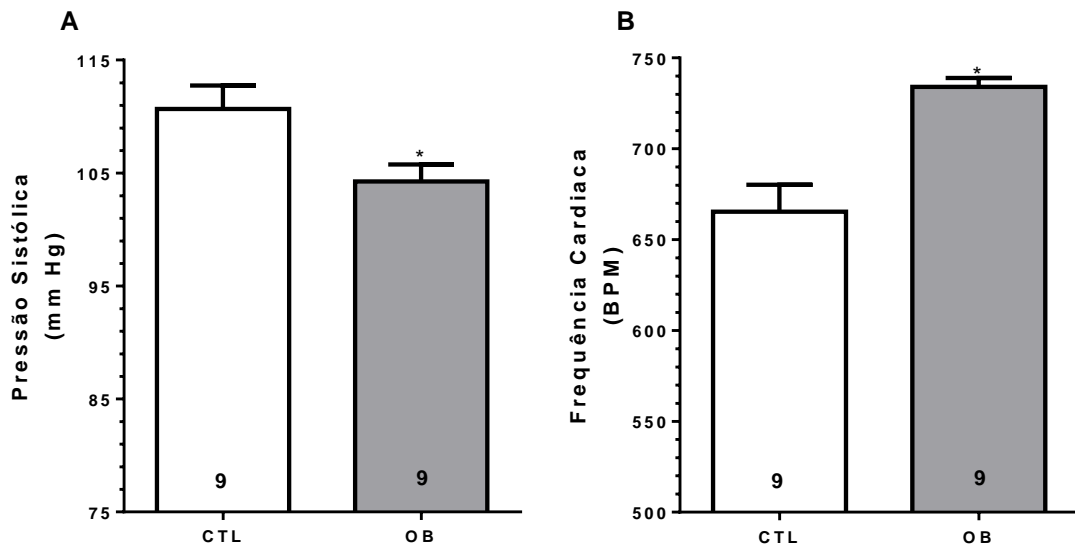
Ao final do período de 16 semanas de dieta, os animais do grupo OB apresentaram aumento na glicemia de jejum quando comparados com os animais do grupo CTL (Figura 7).



**Figura 7** – Glicemia de jejum de animais controle (CTL) e obesos (OB). As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \*  $p < 0,05$  vs CTL.

#### 4.1.6 Pressão arterial

Ao final do período de 16 semanas de dieta, os animais do grupo OB apresentaram redução da pressão arterial sistólica (Figura 8A) e aumento da frequência cardíaca (Figura 8B) em relação aos camundongos do grupo CTL.



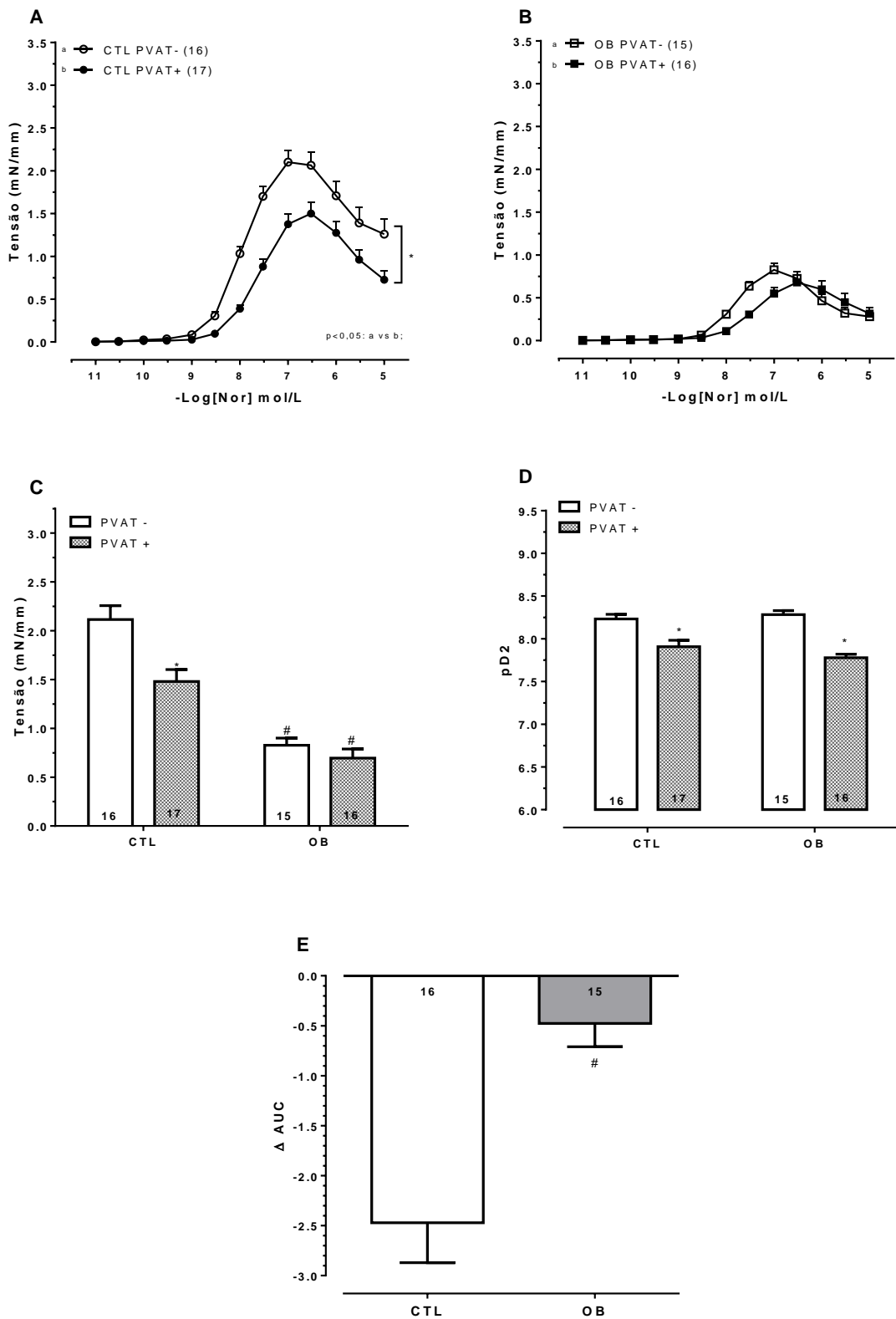
**Figura 8** – Pressão arterial caudal (A) e frequência cardíaca (B) de animais controle (CTL) e obesos (OB). As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \*  $p < 0,05$  vs CTL.

## **4.2 Avaliação da ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica de camundongos obesos**

A noradrenalina produziu resposta vasoconstritora dependente de concentração em todos os anéis de aorta avaliados (Figura 9A e 9B). Podemos observar que o PVAT da aorta dos camundongos CTL exerceu ação anticontrátil (Figura 9A), promovendo diminuição da resposta máxima (Figura 9C) e da sensibilidade à noradrenalina (Figura 9D) em relação aos anéis PVAT-.

Contudo, os animais obesos apresentaram menor efeito anticontrátil promovido pelo PVAT (Figura 9B), só se manifestando como diminuição da sensibilidade à noradrenalina (Figura 9D).

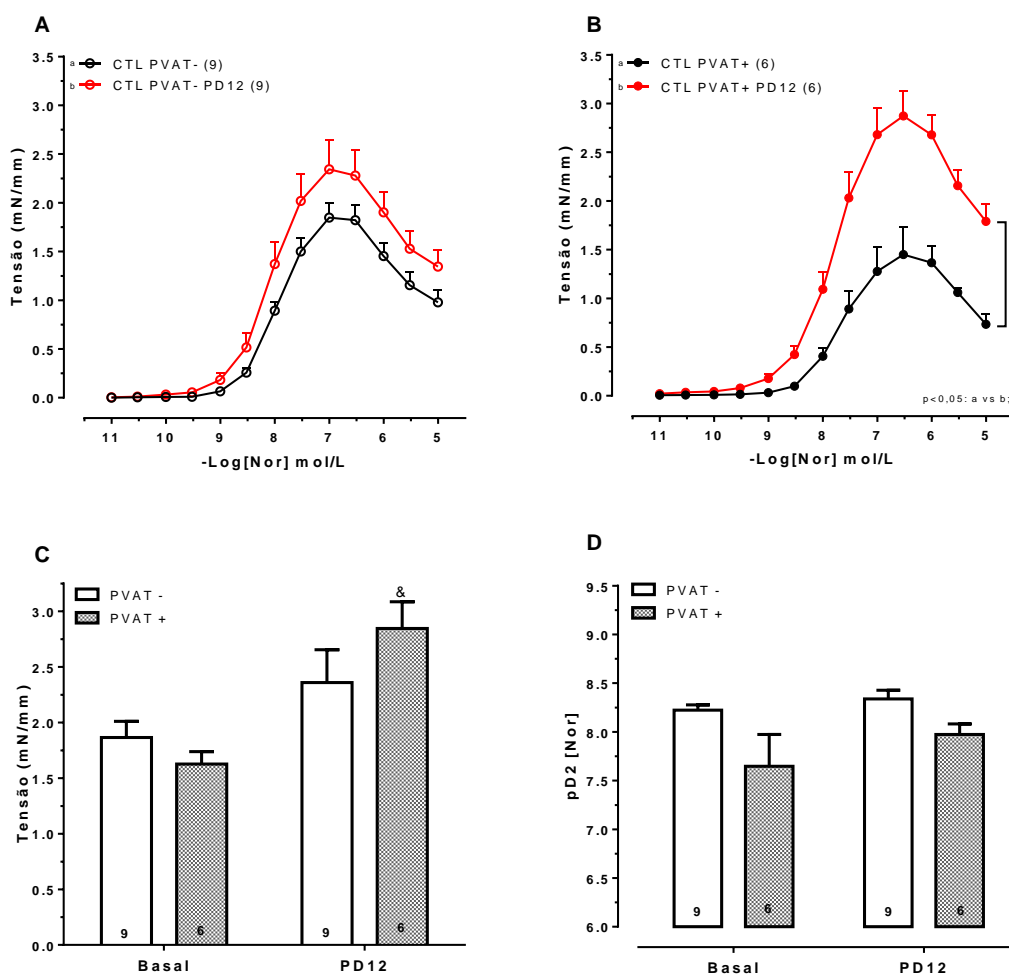
Quando comparamos as respostas dos anéis, PVAT- e PVAT+, dos animais dos grupos CTL e OB, observamos que os anéis PVAT- e PVAT+ dos animais obesos apresentaram diminuição na resposta máxima em relação aos respectivos anéis dos animais controle (Figura 9C). Para avaliar somente o efeito da presença do PVAT nos anéis de ambos os grupos de animais, foi calculada a diferença da área sob a curva para a noradrenalina nos anéis PVAT- pela área sob a curva nos anéis PVAT+, e podemos ver que o efeito do PVAT foi reduzido nos animais obesos (Figura 9E).



**Figura 9** - Gráficos A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- e PVAT+ de camundongos controles (CTL) e obesos (OB), respectivamente. O número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey; Gráficos C, D e E: representam a resposta máxima, a pD2 e variação na área sob a curva ( $\Delta$ AUC) causada pela presença do PVAT na curva à noradrenalina, respectivamente. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \*p<0,05 vs respectivos anéis sem PVAT (PVAT-) e #p<0,05 vs respectivos anéis CTL.

### 4.3 Avaliação da participação do receptor AT<sub>2</sub> na disfunção do PVAT de camundongos obesos

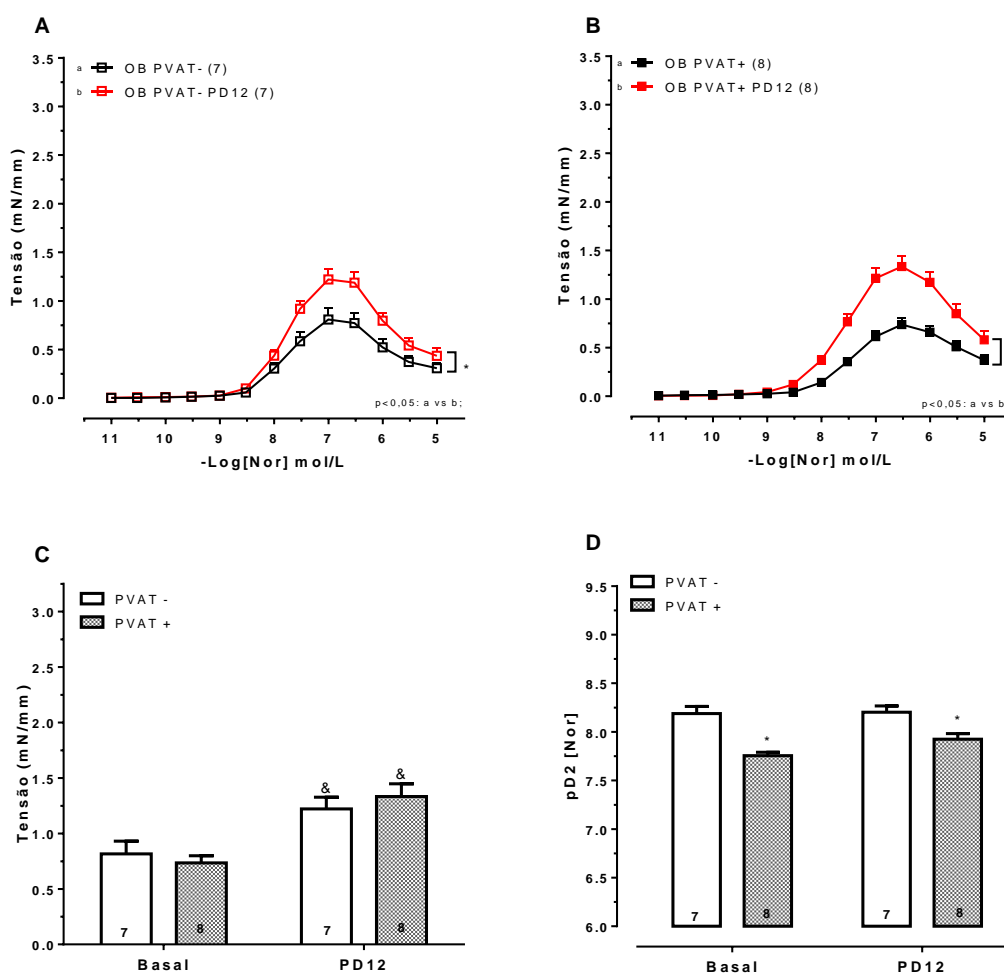
No grupo CTL, a incubação com o antagonista do receptor AT<sub>2</sub> PD123,319 não modificou a resposta à noradrenalina nos anéis PVAT- (Figura 10A, 10C e 10D), porém aumentou essa resposta nos anéis PVAT+ (Figura 10B), em relação aos respectivos anéis não incubados com o antagonista (condição basal). A incubação com o PD123,319 não alterou a pD<sub>2</sub> dos anéis PVAT+ dos animais controle (Figura 10D).



**Figura 10** - Gráfico A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- (A) e PVAT+ (B) de animais controles (CTL) incubados ou não com PD 123,319 (PD12). O número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós--teste Bonferroni. \*p<0,05 vs basal. Gráficos C e D: representam a resposta máxima e a pD<sub>2</sub>, respectivamente, em anéis de aorta PVAT- e PVAT+, basais

ou incubados com PD12 de camundongos CTL. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey. O número no interior das barras representa o número de animais avaliados.  $\&p < 0,05$  vs respectivos anéis basais.

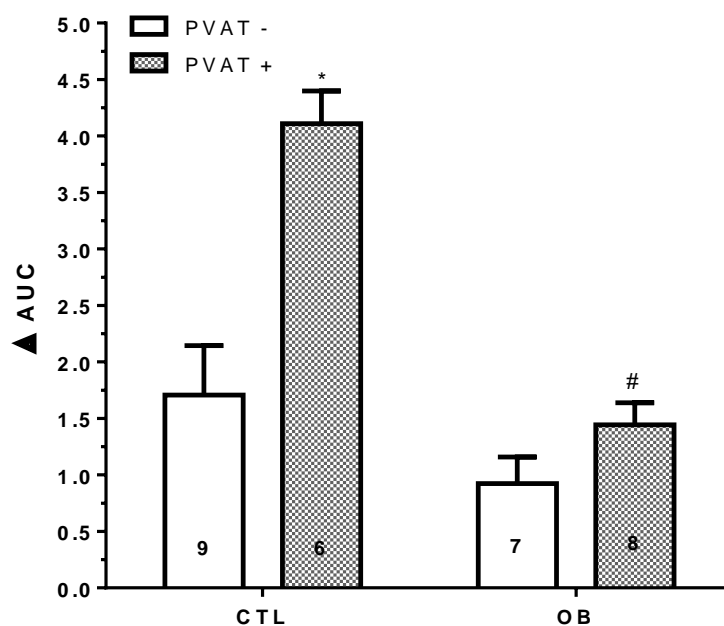
No grupo OB, a incubação com o PD123,319 promoveu aumento na resposta vasoconstritora tanto nos anéis PVAT- (Figura 11A e 11C) quanto nos anéis PVAT+ (Figura 11B e 11C) em relação aos respectivos anéis que não foram incubados com o antagonista. A pD2 foi menor em anéis PVAT+, na presença ou ausência do antagonista, em relação aos anéis PVAT- (Figura 11D).



**Figura 11** - Gráfico A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- (A) e PVAT+ (B) de animais obesos (OB) incubados ou não com PD 123,319 (PD12). O número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós--teste Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs basal. Gráficos C e D: representam a resposta máxima e a pD2, respectivamente, em anéis de aorta PVAT- e PVAT+, basais ou incubados

com PD12 de camundongos OB. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey. O número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* $p < 0,05$  vs respectivos anéis PVAT- e # $p < 0,05$  vs respectivos anéis basais.

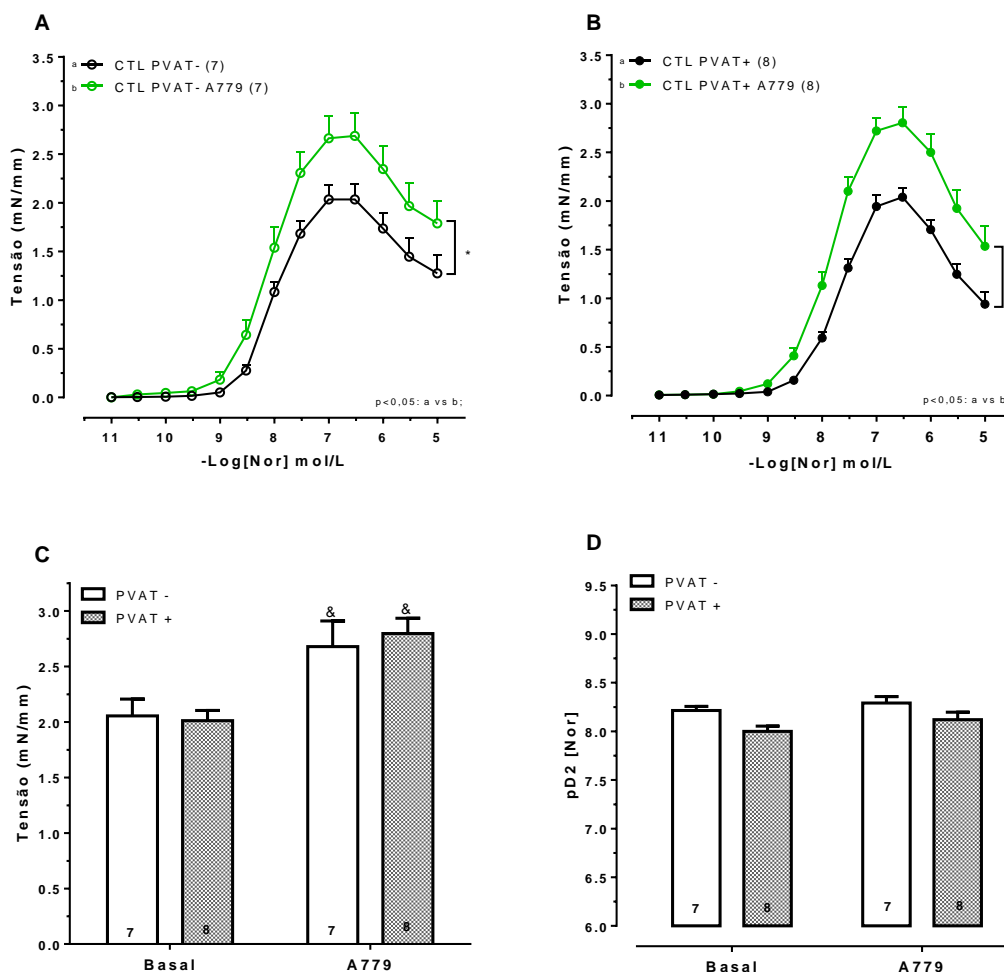
Quando analisamos a diferença do efeito da incubação com o PD123,319, podemos ver que a incubação promoveu maior efeito nos anéis PVAT+ do que nos anéis PVAT- dos animais controles, mas o efeito da incubação foi semelhante nos anéis PVAT- e PVAT+ dos animais obesos (Figura 12). Além disso o efeito da incubação com o antagonista do receptor  $AT_2$  foi menor nos anéis PVAT+ dos camundongos obesos quando comparados com os anéis PVAT+ dos camundongos controle (Figura 12).



**Figura 12** - Variação na área sob a curva ( $\Delta AUC$ ) causada pela incubação do PD 123,319 na curva à noradrenalina em relação à curva para noradrenalina realizada sem a incubação do PD123,319 em anéis PVAT- e PVAT+ dos camundongos controle (CTL) e obesos (OB). Barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* $p < 0,05$  vs anéis PVAT- e # $p < 0,05$  vs CTL.

#### 4.4 Avaliação da participação do receptor Mas na disfunção do PVAT de camundongos obesos

No grupo CTL, a incubação com o antagonista do receptor Mas, A779, aumentou a resposta vasoconstritora à noradrenalina dos anéis PVAT- (Figura 13A) e PVAT+ (Figura 13B) em relação àqueles que não foram incubados. Este aumento também foi observado na resposta máxima, onde tanto os anéis PVAT-, quanto os anéis PVAT+, incubados com o A779 apresentaram contração maior em relação àqueles que não foram incubados (Figura 13C). Contudo, não foram observadas alterações nos valores de pD2 destes anéis na presença do antagonista A779 (Figura 13D).

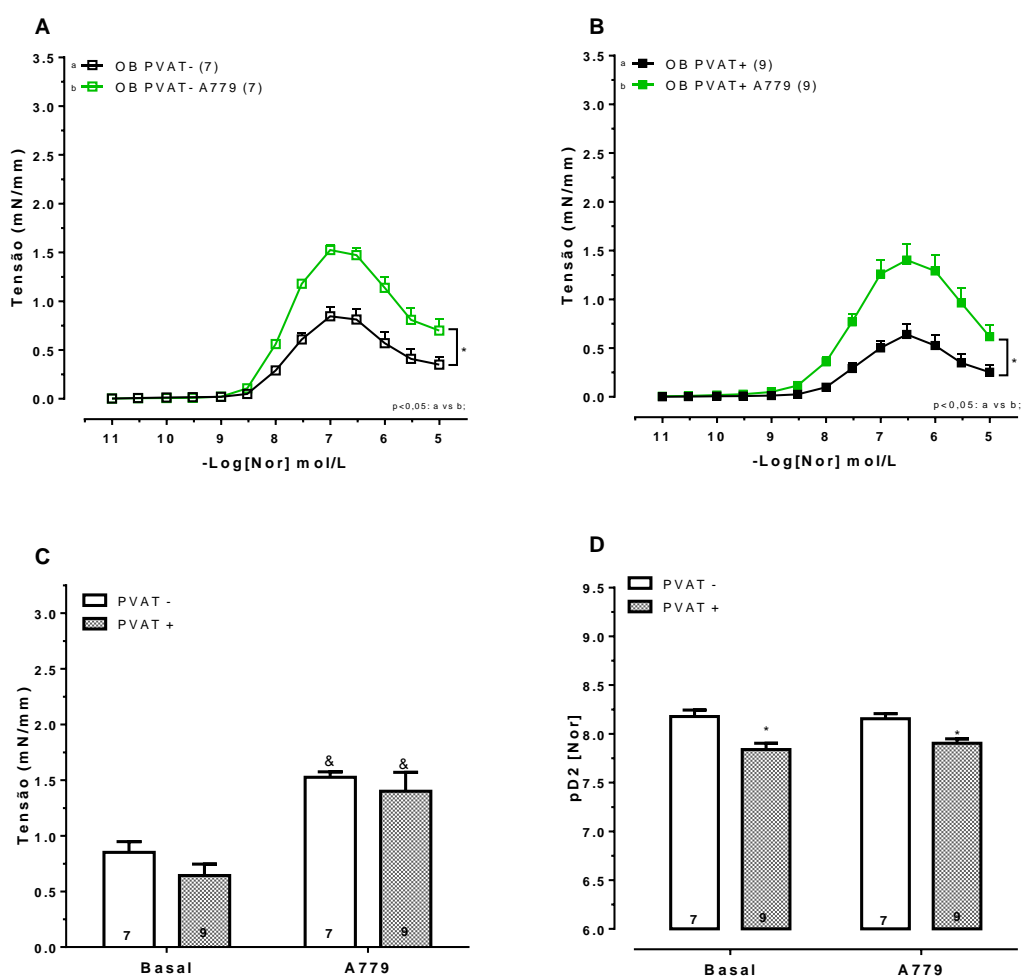


**Figura 13** – Gráfico A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- (A) e PVAT+ (B) de animais controles (CTL) incubados ou não com A779. O número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós--teste Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs basal. Gráficos C e D: representam a resposta



máxima e a pD<sub>2</sub>, respectivamente, em anéis de aorta PVAT- e PVAT+, basais ou incubados com A779 de camundongos CTL. As barras representam média ± erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey. O número no interior das barras representa o número de animais avaliados. &p<0,05 vs respectivos anéis basais.

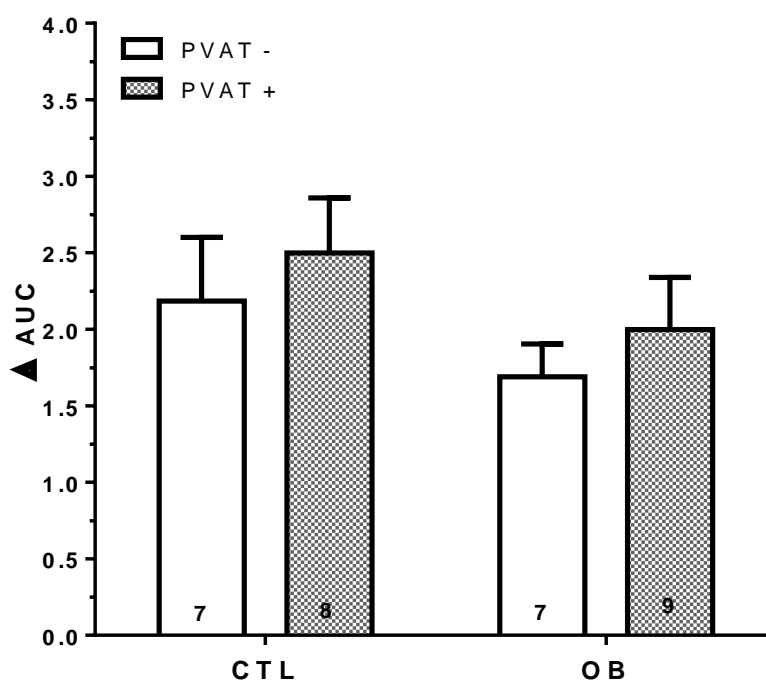
Assim como nos anéis dos animais controle, a incubação com o A779 da aorta de camundongos obesos aumentou a resposta vasoconstritora à noradrenalina dos anéis PVAT- (Figura 14A) e PVAT+ (Figura 14B) em relação àqueles que não foram incubados. Este aumento também foi observado na resposta máxima, onde tanto os anéis PVAT-, quanto os anéis PVAT+, incubados com o A779 apresentaram contração maior em relação àqueles que não foram incubados (Figura 14C). Além disso, os anéis PVAT+ apresentaram diminuição da pD<sub>2</sub> na situação basal e quando incubados com o A779 em relação aos anéis PVAT- (Figura 14D).



**Figura 14 - Gráfico A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- (A) e PVAT+ (B) de animais obesos (OB) incubados ou não com A779. O número entre parênteses**

refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós--teste Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs basal. Gráficos C e D: representam a resposta máxima e a  $pD_2$ , respectivamente, em anéis de aorta PVAT- e PVAT+, basais ou incubados com A779 de camundongos OB. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey. O número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* $p < 0,05$  vs respectivos anéis PVAT- e  $\&p < 0,05$  vs respectivos anéis basais.

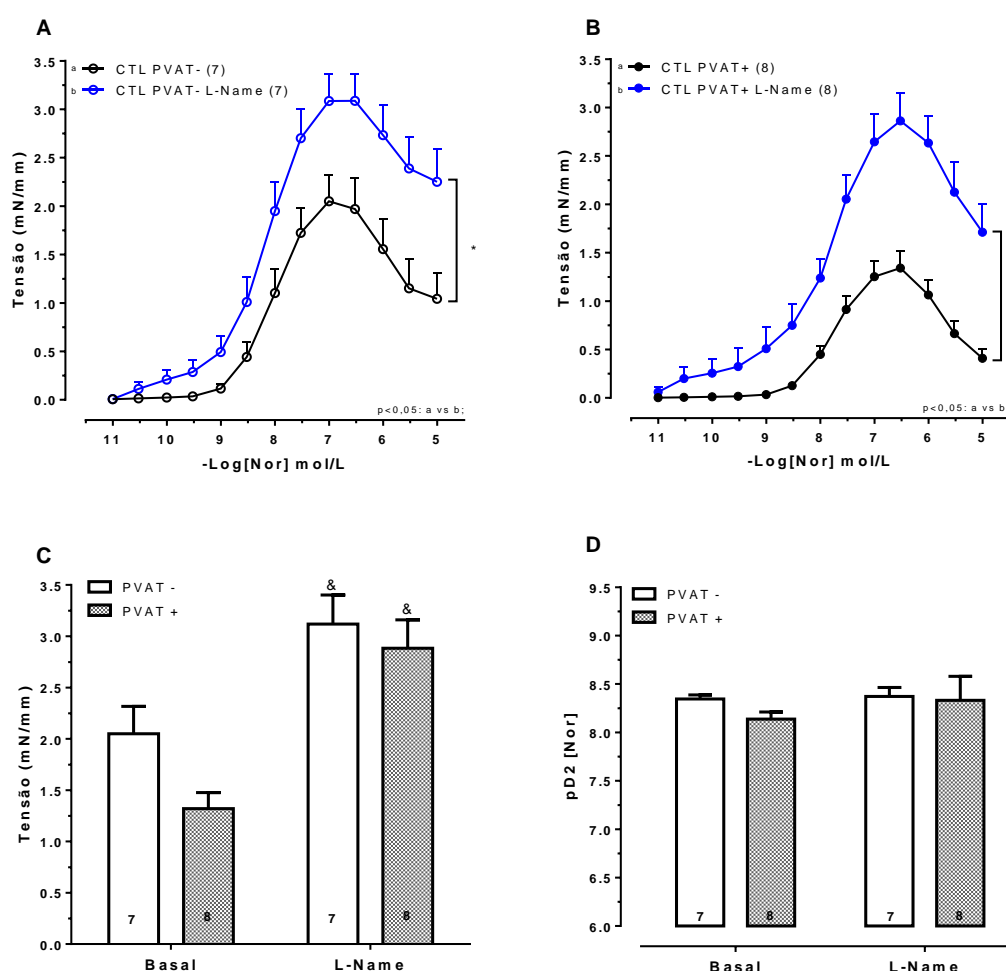
Quando comparamos o efeito da incubação do A779 entre os grupos, podemos ver que não houve diferença no efeito promovido pelo antagonista do receptor Mas entre os anéis PVAT- e PVAT+ de ambos os grupos (Figura 15).



**Figura 15** - Variação na área sob a curva ( $\Delta AUC$ ) causada pela incubação do A779 na curva à noradrenalina em relação à curva noradrenalina basal. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados.

## 4.5 Avaliação da participação do NO na disfunção do PVAT de camundongos obesos

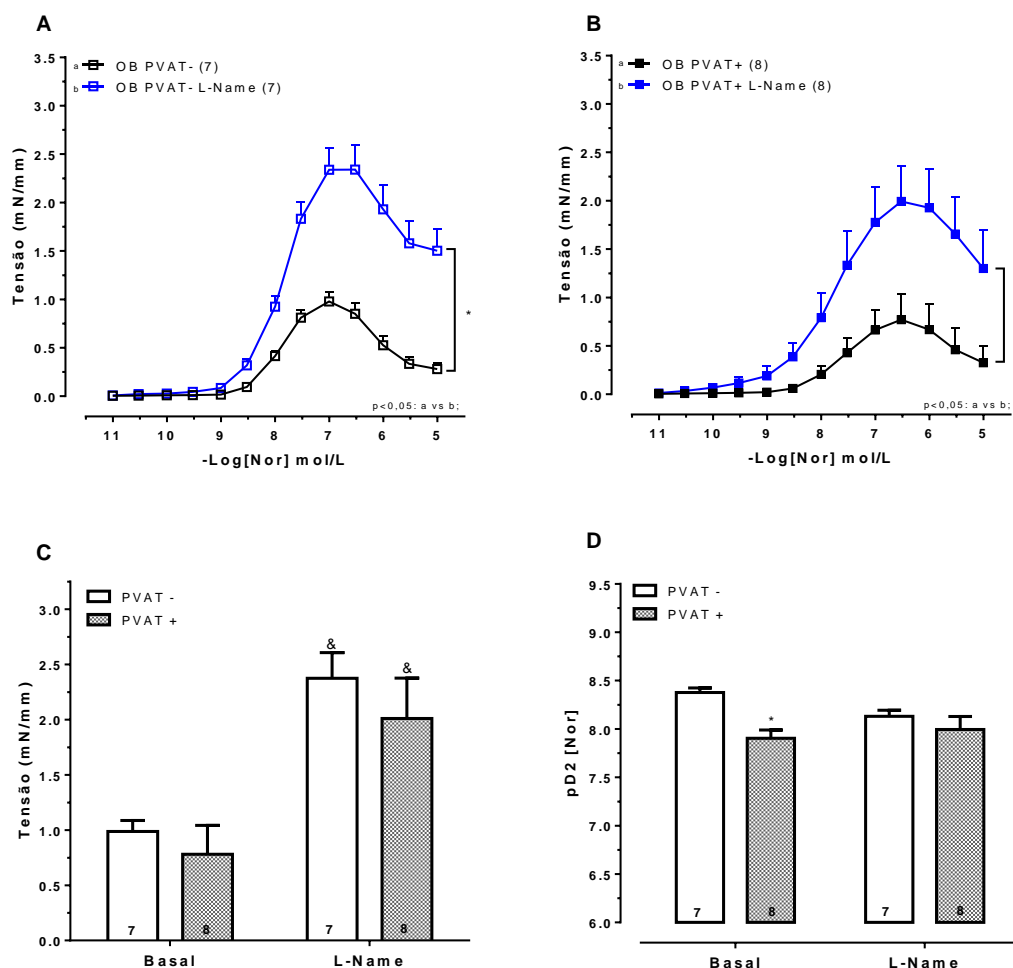
No grupo CTL, a incubação com o inibidor não seletivo da NOS L-NAME aumentou a resposta vasoconstritora à noradrenalina dos anéis PVAT- (Figura 16A) e PVAT+ (Figura 16B) em relação àqueles que não foram incubados. Este aumento também foi observado na resposta máxima, onde tanto os anéis PVAT-, quanto os anéis PVAT+, incubados com o L-NAME apresentaram contração maior em relação àqueles que não foram incubados (Figura 16C), porém não foram observadas alterações nos valores de pD2 destes anéis (Figura 16D).



**Figura 16** - Gráfico A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- (A) e PVAT+ (B) de animais controles (CTL) incubados ou não com L-NAME. O número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós--teste Bonferroni. \* $p < 0,05$  vs basal. Gráficos C e D: representam a resposta máxima e a pD2, respectivamente, em anéis de aorta PVAT- e PVAT+, basais ou incubados

com L-NAME de camundongos CTL. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey. O número no interior das barras representa o número de animais avaliados.  $\&p < 0,05$  vs respectivos anéis basais.

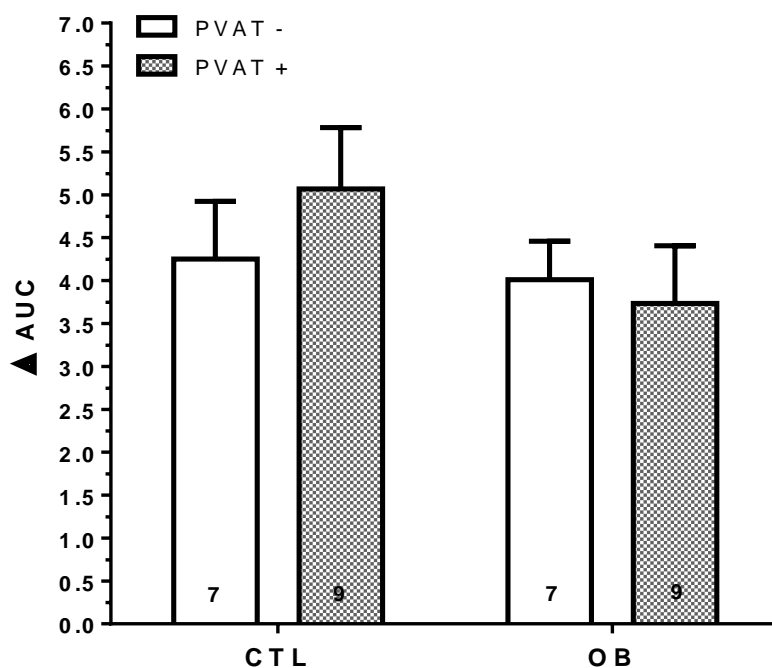
Nos anéis dos animais obesos, também podemos observar aumento da contração à noradrenalina dos anéis PVAT- (Figura 17A e 17C) e PVAT+ (Figura 17B e 17C) incubados com L-NAME em relação aos anéis não incubados. Em relação à pD2, observamos a ausência da diminuição da pD2 provocado pelo PVAT na presença do L-NAME (Figura 17D).



**Figura 17** - Gráfico A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- (A) e PVAT+ (B) de animais obesos (OB) incubados ou não com L-NAME. O número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós-teste Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs basal. Gráficos C e D: representam a resposta máxima e a pD2, respectivamente, em anéis de aorta PVAT- e PVAT+, basais ou incubados com L-NAME de camundongos OB. As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias,

pós-teste Tukey. O número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* $p < 0,05$  vs respectivos anéis PVAT- e  $p < 0,05$  vs respectivos anéis basais.

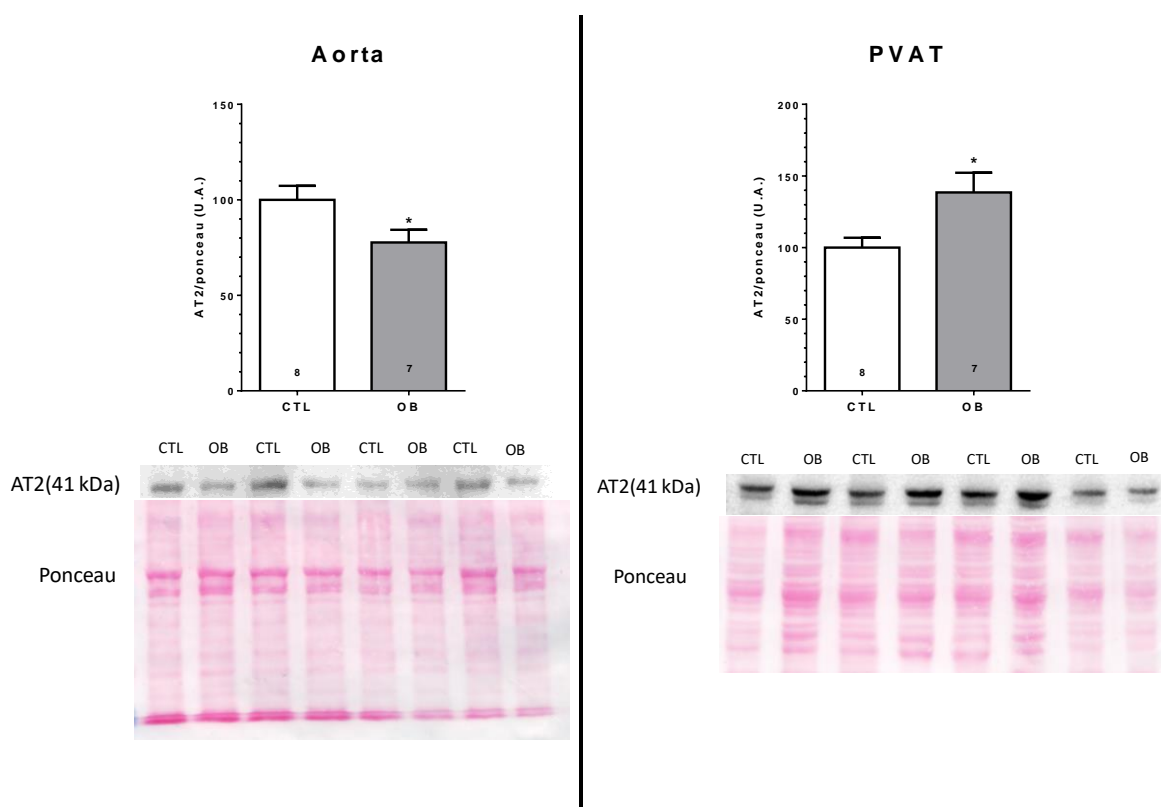
Quando comparamos o efeito da incubação do L-NAME entre os grupos, podemos ver que não houve diferença no efeito promovido pela inibição da NOS entre os anéis PVAT- e PVAT+ de ambos os grupos (Figura 18).



**Figura 18** - Variação na área sob a curva ( $\Delta AUC$ ) causada pela incubação do L-NAME na curva à noradrenalina em relação à curva noradrenalina basal. Barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados

## 4.6 Expressão proteica do receptor AT<sub>2</sub>

Quando fomos analisar o conteúdo proteico do receptor AT<sub>2</sub>, observamos que a expressão deste receptor está diminuída na aorta dos camundongos obesos, porém está aumentada no PVAT destes animais quando comparados aos animais controle (Figura 19).



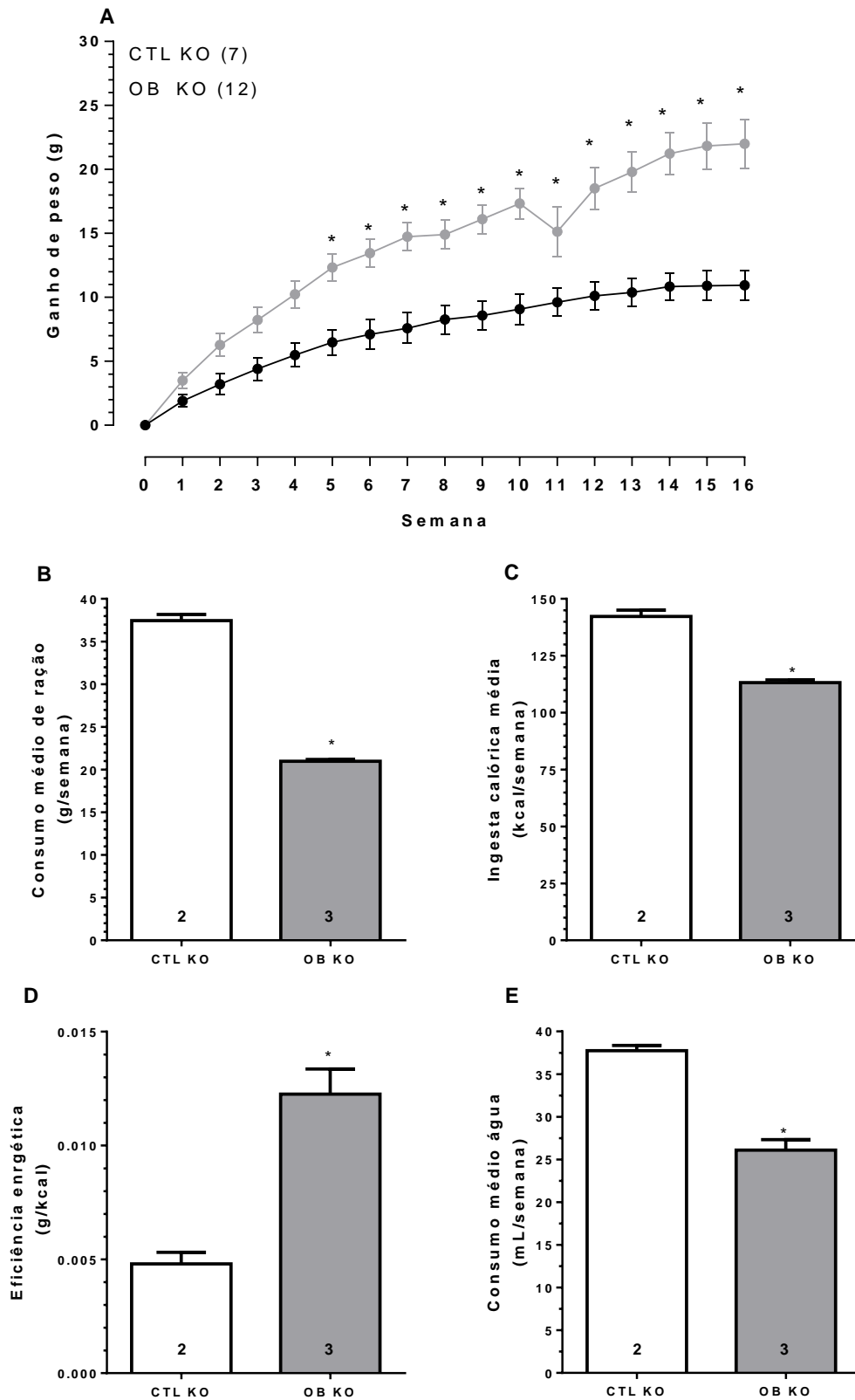
**Figura 19** – Expressão proteica do receptor AT<sub>2</sub> em aorta e PVAT de animais controle (CTL) e obesos (OB). As barras representam média ± erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* p<0,05 vs CTL. Abaixo os *immunoblottings* representativos para o receptor AT<sub>2</sub> e das respectivas membranas coradas com Ponceau.

## **4.7 Caracterização do modelo de obesidade nos camundongos nocautes para o receptor AT<sub>2</sub>**

### **4.7.1 Ganho de massa, consumo de ração, calorias e água**

A Figura 20A mostra o ganho de massa corpórea de camundongos nocautes alimentados com ração padrão (CTL KO) e ração hiperlipídica (OB KO) ao longo de 16 semanas. Os camundongos do grupo OB KO passaram a apresentar maior aumento no ganho de peso do que os do grupo CTL KO a partir da 5ª semana de dieta (Figura 20A).

Os camundongos OB KO apresentaram menor consumo semanal médio de ração (Figura 20B) e de calorias (Figura 20C), porém apresentaram maior eficiência energética do que os do grupo CTL KO (Figura 20D). Além disso, os camundongos OB KO apresentaram menor consumo de água do que os CTL KO (Figura 20E).



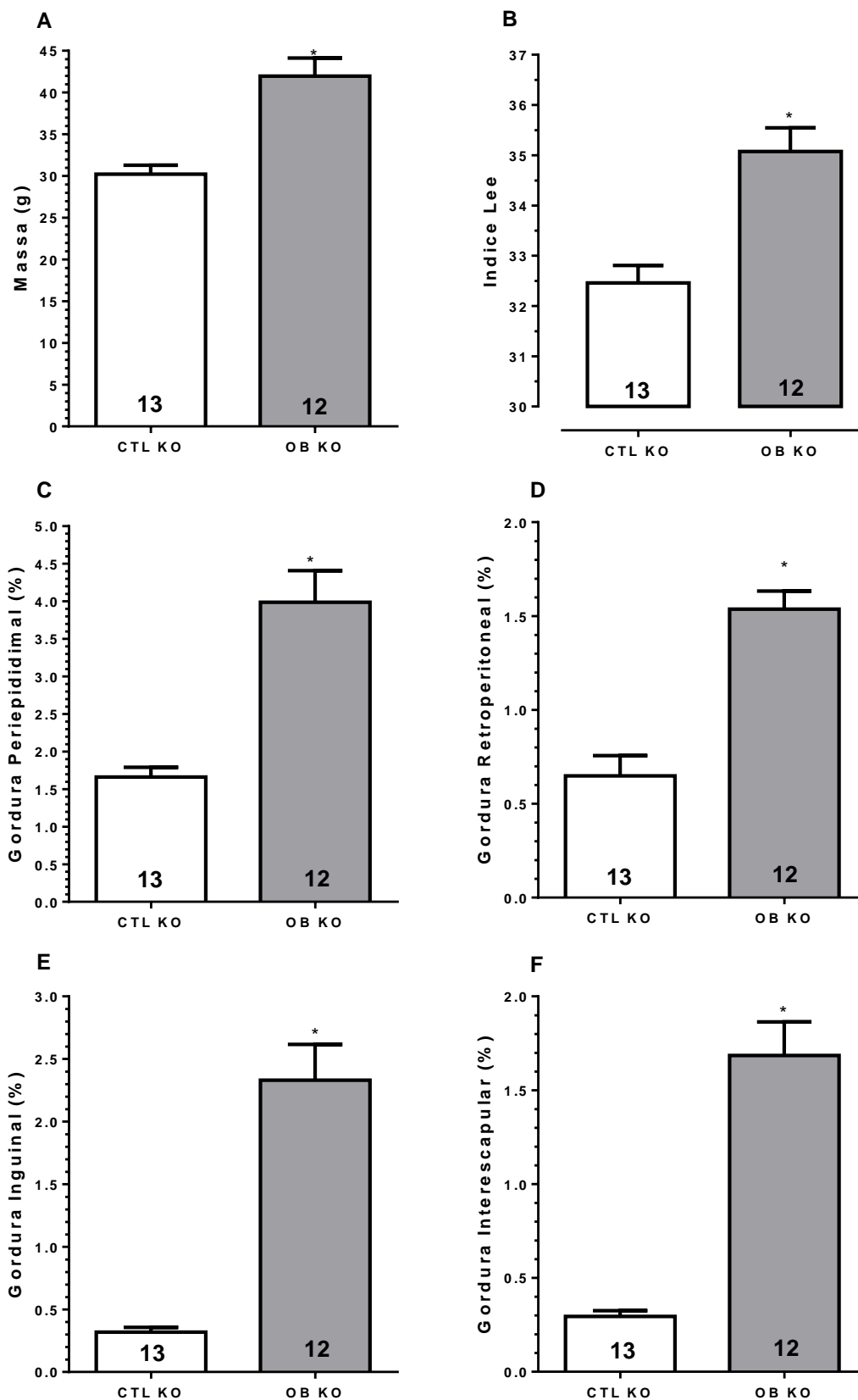
**Figura 20** - Ganho de peso (A), consumo semanal médio de ração (B) e calorias (C), eficiência energética média [ganho médio de massa corpórea (g)/ energia total ingerida (kcal)] (D) e consumo médio de água (E) de animais controle nocaute (CTL KO) e obesos nocaute (OB KO). Gráfico A: cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Bonferroni, o valor entre parênteses representa o número de animais acompanhados por grupo. Gráficos B, C, D e E: as barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; teste "t" Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de caixas avaliadas. \*  $p < 0,05$  vs CTL KO.



#### **4.7.2 Massa corpórea final e adiposidade**

Assim como observado com os animais selvagens, os animais do grupo OB KO apresentaram, ao final do período de 16 semanas de dieta, aumento da massa corpórea (Figura 21A) e do índice de Lee (Figura 21B) quando comparado aos do grupo CTL KO.

Camundongos OB KO apresentaram aumento em todos os depósitos de gordura que foram avaliados, sendo eles, o depósito de gordura periepididimal (Figura 21C), retroperitoneal (Figura 21D), inguinal (Figura 21E) e interescapular (Figura 21F), quando comparado aos camundongos do grupo CTL KO.



**Figura 21** - Massa corpórea final (A), índice de Lee {[massa corpórea<sup>1/3</sup> (g)/comprimento naso-anal (cm)] x 100} (B), porcentagem de gordura {[massa dos depósitos de gordura (g)/ massa corpórea (g)] x 100} periepididimal (C), retroperitoneal (D), inguinal (E) e interscapular (F) de animais controle nocaute (CTL KO) e obesos nocaute (OB KO). As barras representam a média ± erro padrão da média; teste “t” Student não-pareado, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* p<0,05 vs CTL KO.

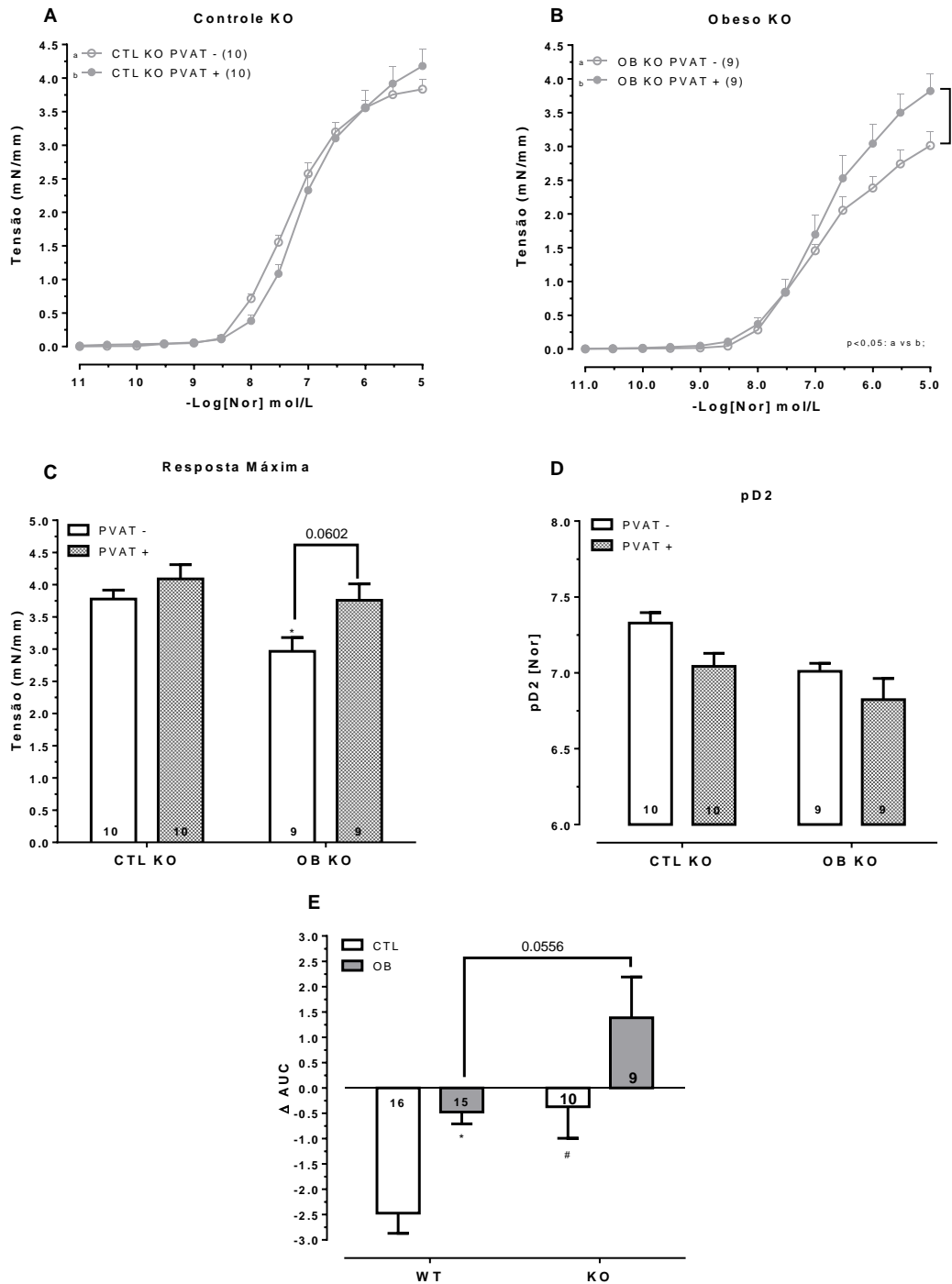
#### **4.8 Avaliação da ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica de camundongos nocaute para o receptor AT<sub>2</sub>**

A noradrenalina produziu resposta vasoconstritora dependente de concentração em todos os anéis de aorta avaliados (Figura 22A e 22B). Podemos observar que o PVAT da aorta dos camundongos CTL KO não exerce ação anticontrátil (Figura 22A), sendo que a resposta máxima (Figura 22C) e a sensibilidade (Figura 22D) à noradrenalina são semelhantes entre os anéis PVAT- e PVAT+.

Contudo, o PVAT dos animais OB KO apresentou um efeito pró-contrátil (Figura 22B), mas a resposta máxima dos anéis PVAT- e PVAT+ não foi estatisticamente diferente ( $p=0,06$ ) (Figura 22C). A presença do PVAT nos anéis desses camundongos não alterou a sensibilidade à noradrenalina (Figura 22D).

Quando comparamos os anéis PVAT- e PVAT+ entre os grupos CTL KO e OB KO, podemos observar que os anéis PVAT- dos animais OB KO apresentaram diminuição na resposta máxima quando comparados aos anéis PVAT- dos camundongos CTL KO (Figura 22C).

Para avaliarmos o efeito da presença do PVAT nos camundongos de ambos os genótipos e dieta, comparamos o  $\Delta AUC$  provocado pela presença do PVAT. Como já observado anteriormente, os animais selvagens do grupo OB apresentaram reduzido efeito anticontrátil do PVAT em relação aos animais selvagens do grupo CTL. Quando analisamos os animais nocautes, podemos observar uma diminuição do efeito anticontrátil do PVAT em relação ao respectivo grupo selvagem. Já nos animais nocautes do grupo OB KO, podemos ver uma inversão do efeito do PVAT, sendo que houve uma variação positiva da  $\Delta AUC$  em relação aos camundongos selvagens do grupo OB ( $p=0,055$ ), indicando um efeito pró-contrátil (Figura 22E).



**Figura 22** - Gráficos A e B: Curvas concentração-resposta para noradrenalina em anéis de aorta PVAT- e PVAT+ de camundongos controles nocautes (CTL KO) e obesos nocautes (OB KO), respectivamente. O número entre parênteses refere-se ao número de animais avaliados. Cada ponto representa média  $\pm$  erro padrão da média, ANOVA-duas vias, pós-teste Bonferroni; \* $p < 0,05$  vs PVAT-. Gráficos C, D: representam a resposta máxima e a pD2, respectivamente. Gráfico E representa a variação na área sob a curva ( $\Delta$ AUC) causada pela presença do PVAT na curva à noradrenalina de animais selvagens (WT) e nocautes (KO) dos grupos controle (CTL) e obeso (OB). As barras representam média  $\pm$  erro padrão da média; ANOVA-duas vias, pós-teste Tukey, o número no interior das barras representa o número de animais avaliados. \* $p < 0,05$  vs respectivos anéis CTL e # $p < 0,05$  vs respectivos anéis WT.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi primeiro a demonstrar de forma direta, com o uso de animais nocaute, a participação do receptor AT<sub>2</sub> na função anticontrátil do PVAT. Além disso, demonstramos que o prejuízo da função anticontrátil de animais obesos é por uma menor participação do receptor AT<sub>2</sub>.

O primeiro passo do presente trabalho foi caracterizar o modelo de obesidade induzido por dieta hiperlipídica. Apesar de o modelo ser amplamente utilizado na literatura (Schreyer et al., 1998; Lin et al., 2000; Schmid et al., 2004; Gallou-Kabani et al., 2007), foi observado heterogeneidade fenotípica em resposta a mesma dieta hiperlipídica dentro da mesma linhagem de animais (Burcelin et al., 2002; Chaar et al., 2016; Dumas et al., 2017).

Observamos que, a partir da 2ª semana de dieta, os animais alimentados com dieta hiperlipídica passaram a apresentar aumento no ganho de peso, que se manteve até o final da dieta. Além do considerável aumento do ganho de peso, investigamos se isso era devido ao aumento da quantidade de gordura corporal e, então, realizamos uma análise temporal da composição corporal em um grupo de animais. Observamos que, a partir da 4ª semana de dieta, os animais alimentados com dieta hiperlipídica passaram a apresentar maior quantidade de gordura corporal, que se manteve durante todo o período da dieta.

Simultaneamente, foi observada uma queda na porcentagem de massa magra dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica a partir da 4ª semana de dieta e se mantendo até o fim das 16 semanas. Entretanto, essa diminuição da massa magra relativa é devido a um aumento mais proeminente na gordura corporal, pois a massa magra absoluta aumenta ao longo do período da dieta, alcançando diferença estatística nas duas últimas semanas. O aumento da gordura corporal e, conseqüentemente, na massa do animal como um todo, faz com que a relação de massa magra/massa corporal fique diminuída.

Devido ao fato de o depósito visceral estar mais relacionado com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Fitzgibbons e Czech, 2014; Wang et al., 2008), avaliamos a distribuição do tecido adiposo e observamos que todos os depósitos de tecido adiposo avaliados estavam aumentados nos animais obesos,

corroborando os dados obtidos em nosso grupo de pesquisa (Soares, 2014; Inada, 2016; Hashimoto, 2016; Silva, 2018).

Os animais do grupo obeso, entretanto, apresentaram diminuição da ingestão de ração e calorias, que difere dos modelos de obesidade relacionado à ausência da leptina (*ob/ob*), do seu receptor (*db/db*) ou de vias de sinalização do seu receptor STAT3 (*s/s*) que apresentam hiperfagia associada ao aumento de peso (Lutz, Woods, 2012). Entretanto, quando analisada a eficiência energética da dieta, cálculo feito a partir da média de calorias ingeridas pela massa ganha, a dieta foi muito mais eficiente energeticamente.

A maior eficiência energética pode estar relacionada a uma diminuição no gasto calórico, acompanhado de um *down-regulation* de genes relacionados à lipólise, metabolismo de ácidos graxos, transdução de energia mitocondrial e sensibilidade à insulina (Choi et al., 2015). Como mostrado por Williams e colaboradores (2003), ao analisamos o consumo de oxigênio, observamos que este parâmetro estava diminuído nos camundongos obesos, o que ajuda a entender o maior ganho de peso mesmo com menor consumo de calorias por esses animais. Além disso, observamos uma leve diminuição na atividade ambulatoria voluntária, esse fenômeno já foi relatado em diferentes linhagens alimentadas com dieta hiperlipídica (Jo et al., 2009).

Como já demonstrado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, os animais submetidos à dieta hiperlipídica por 16 semanas apresentam uma alteração na homeostase da glicose, com aumento da glicemia de jejum (Soares, 2014; Inada, 2016; Hashimoto, 2016). E já foi demonstrado que este protocolo de indução de obesidade leva ao aumento da insulinemia, além de apresentar resistência à insulina (avaliada pelo índice HOMA-IR) e hiperfuncionalidade das células  $\beta$  pancreáticas (avaliada pelo índice HOMA- $\beta$ ) (Inada, 2016).

Sabemos que a obesidade é um fator que predispõe fortemente a doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão arterial. Então, avaliamos a pressão arterial pelo método de pletismografia de cauda e observamos uma surpreendente leve diminuição da pressão arterial no grupo de animais obesos. Contudo, ainda é discutível o efeito da dieta hiperlipídica sob a pressão arterial. Na literatura temos exemplos de estudos que, usando a aferição direta, encontraram aumento na pressão arterial média, sistólica e diastólica de animais obesos com 8 semanas de dieta (Chaar et al., 2016), assim como estudos que mostram que camundongos alimentados com

dieta hiperlipídica por 20 semanas não apresentam alteração na pressão arterial média, sistólica e diastólica (Bruder-Nascimento et al., 2017). Também foi relatado por Mark et al. (1999) um efeito oposto em dois modelos genéticos de obesidade, tendo visto uma diminuição da pressão arterial em animais *ob/ob* e aumento da pressão arterial média, sistólica e diastólica em camundongos *agouti*, que desenvolvem obesidade por diferentes mecanismos. Isso exemplifica a complexidade da obesidade e da sua relação com doenças vasculares.

Contudo, os animais obesos apresentaram aumento na frequência cardíaca, como já observado anteriormente por Bruder-Nascimento e colaboradores (2017), que sugerem que a obesidade leva a um prejuízo do controle autonômico do sistema cardiovascular, por provocar alterações no tônus simpático. Uma explicação para aumento da frequência cardíaca e redução/não alteração da pressão arterial é que o estímulo simpático constante na vasculatura ativa mecanismos compensatórios de taquifilaxia dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, dessensibilizando-os e levando à redução da contratilidade vascular a agentes adrenérgicos (Chantemèle et al., 2009; Chantemele et al., 2011; Bruder-Nascimento et al., 2017). Nossos resultados podem ser explicados por esse mecanismo, uma vez que a resposta à noradrenalina de aorta de camundongos obesos foi reduzida em relação aos camundongos controle.

De acordo com o Pubmed, o primeiro trabalho a falar sobre tecido adiposo e suas consequências quando disfuncional, embora esse termo não tenha sido utilizado pelo autor, foi o médico escocês David Craigie em 1837. Neste trabalho ele já destacava a importância do tecido adiposo por ele estar extensamente distribuído em todo o organismo e estar em íntimo contato com os órgãos e com os vasos sanguíneos. O autor aborda no texto como a inflamação do tecido adiposo está relacionado a patologias, sendo que ele destaca a influência da inflamação no tecido adiposo que circunda a carótida com as patologias nesse vaso sanguíneo (Craigie, 1837). Parte do tecido adiposo mencionado no texto é o PVAT, embora o termo só tenha sido usado pela primeira vez em 1991 por Soltis e Cassis, quando eles, pela primeira vez, mostraram o papel do PVAT no controle do tônus vascular. O trabalho de Soltis e Cassis em 1991 mudou como se enxergava o vaso sanguíneo, adicionando mais uma camada de complexidade ao estudo do controle do tônus do músculo liso vascular, pois pela primeira vez o PVAT foi visto atuando de forma parácrina e não servindo somente como suporte estrutural para o vaso.

O estudo do PVAT só apareceu na literatura científica novamente em 2001, quando Löhn e colaboradores (2001) mostraram que o PVAT produzia um fator relaxante, não identificado, que era liberado no meio e podia ser transferido. O achado que de certa forma se assemelha ao trabalho de Ignarro e colaboradores (1987), que mostraram que um fator derivado do endotélio era produzido pelo endotélio e que podia ser transferido de uma preparação de artéria para outra. O estudo do PVAT, entretanto, se manteve discreto até a metade da década de 2000, onde voltou a ganhar força e vem crescendo anualmente.

Quando comparamos o efeito causado pela presença do PVAT na resposta à noradrenalina, podemos ver que o PVAT do animal controle diminuiu a AUC em uma magnitude muito maior do que o PVAT do animal obeso, que apresentou um efeito muito sutil, mostrando que a obesidade leva à perda do efeito anticontrátil do PVAT. Nossos resultados corroboram estudos da literatura que mostraram a perda do efeito anticontrátil promovido pelo PVAT da aorta torácica e artérias mesentéricas em diferentes modelos de obesidade (Gao et al., 2005; Marchesi et al., 2009; Ma et al., 2010; Fernandez-Alfonso et al., 2013, Gil-Ortega et al., 2014; Xia et al. 2016; Hashimoto, 2016).

No presente estudo, avaliamos a participação do sistema renina-angiotensina no efeito anticontrátil do PVAT, principalmente dos eixos vasodilatadores ECA2/angiotensina 1-7/receptor Mas e ECA/angiotensina II/receptor AT<sub>2</sub>, além de avaliar a participação do NO neste efeito, já que ambos os eixos levam à produção dessa molécula (Hiyoshi et al., 2005; Sampaio et al., 2006).

Utilizando ferramenta farmacológica e animais nocautes, nossos resultados mostram que menor participação do receptor AT<sub>2</sub> está envolvida na perda do efeito anticontrátil do PVAT da aorta torácica em camundongos obesos. De fato, a participação do receptor AT<sub>2</sub> no efeito anticontrátil do PVAT da aorta torácica foi demonstrado anteriormente por Nóbrega e colaboradores (2019) e confirmados no presente estudo.

Fomos então avaliar a expressão do receptor AT<sub>2</sub> tanto na aorta quanto no PVAT da aorta dos animais. Observamos uma diminuição na expressão do receptor AT<sub>2</sub> na aorta, porém um aumento da sua expressão no PVAT dos camundongos obesos. A começar pelo PVAT, já foi demonstrado que o receptor AT<sub>2</sub> em outros depósitos de tecido adiposo participa do processo de diferenciação de adipócitos



(Shum et al., 2013; Sysoeva et al., 2017) e que em animais nocautes para o receptor AT<sub>2</sub>, quando submetidos a uma dieta hiperlipídica, há diminuição no tamanho do adipócito e redução da gordura epididimal (Yvan-Charvet et al., 2005). Esse aumento da expressão do receptor AT<sub>2</sub> pode estar relacionado com o aumento da quantidade de PVAT que é observado em animais obesos (Inada, 2016), além da hipertrofia do adipócito do PVAT (Greenstein et al., 2009) e aumento da proporção área do PVAT/área para aorta (Marchesi et al., 2009).

Apesar da participação do receptor AT<sub>2</sub> na diferenciação de adipócitos, nos camundongos KO, assim como observado com os camundongos WT, a dieta hiperlipídica levou ao aumento do ganho de peso e da adiposidade. Concluímos, então, que a dieta hiperlipídica foi bem-sucedida em induzir obesidade nos camundongos KO para o receptor AT<sub>2</sub> e que a participação desse receptor no processo de diferenciação de adipócitos precisa ser melhor compreendido.

Quanto à diminuição da expressão do receptor AT<sub>2</sub> na aorta dos camundongos obesos, isso poderia ser um dos mecanismos que explica a diminuição do efeito anticontrátil, pois já foi demonstrado que ativação do receptor AT<sub>2</sub> leva a aumento da produção de NO, aumento da fosforilação da eNOS no resíduo Ser<sup>1177</sup>, um sítio conhecido que quando fosforilado aumenta a produção de NO, e diminuição da fosforilação dos resíduos Tyr<sup>657</sup> e Thr<sup>495</sup>, resíduos que quando fosforilados diminuem a produção de NO (Hagihara et al., 2014; Peluso et al., 2018). Recentemente também foi demonstrado que quando ativado no PVAT o receptor AT<sub>2</sub> atua produzindo efeito anticontrátil por liberação de NO e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nóbrega et al., 2019).

A diminuição do efeito anticontrátil mediado pelo receptor AT<sub>2</sub> pode ser devido à diminuição da sua expressão na aorta dos camundongos obesos, mas nosso grupo também já havia demonstrado que há uma diminuição da atividade da ECA no PVAT da aorta de camundongos obesos (Inada, 2016), que poderia reduzir a formação de angiotensina II, o principal peptídeo que se liga a esse receptor.

Em animais OB KO, o PVAT passou a apresentar efeito pró-contrátil. Esse aumento da contração pode ser devido ao aumento da atividade da ECA e da expressão do receptor AT<sub>1</sub>, que já foi demonstrado no córtex renal de animais nocautes para o receptor AT<sub>2</sub> (Ali et al., 2016), o que ajudaria a entender o efeito contrátil do PVAT desses animais, pois a angiotensina II produzida atuaria somente nos receptores AT<sub>1</sub>, que conhecidamente promovem vasoconstrição.

O NO exerce um papel importante no efeito anticontrátil do PVAT da aorta assim como em outros leitos vasculares (Marchesi et al., 2009; Aghamohammadzadeh et al., 2015; Victório et al., 2016; Bussey et al., 2018; Nóbrega et al., 2019). Diferentemente do PVAT da aorta torácica, o PVAT da aorta abdominal não exerce ação anticontrátil e isso parece ser devido ao fato da reduzida capacidade desse PVAT em produzir NO (Victório et al., 2016). Na obesidade o PVAT de camundongos obesos pode, em um primeiro momento, aumentar a produção de NO, no que se acredita ser um mecanismo compensatório para preservar a função vascular (Gil-Ortega et al., 2010). Contudo, pode haver diminuição da biodisponibilidade do NO no longo prazo (Gil-Ortega et al., 2014). Além disso, na obesidade, o PVAT diminui o relaxamento a ACh por diminuir a biodisponibilidade do NO (Xia et al. 2016). Essa diminuição do NO na obesidade já foi demonstrado tanto ser causado pelo desacoplamento da eNOS, quanto pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (Gil-Ortega et al., 2014; Xia et al. 2016). Contudo, diferente do observado na literatura, ao analisarmos os efeitos do L-NAME sobre o efeito do PVAT, pudemos ver que este era semelhante entre todos os grupos experimentais, mostrando que a disfunção do PVAT da aorta dos camundongos obesos não é devido à diminuição de NO.

Contudo, produção de NO não é o único mecanismo ativado pelo receptor  $AT_2$  que pode atuar diminuindo a contração vascular. Já foi demonstrado separadamente e em tecidos diferentes que a ativação do receptor  $AT_2$  leva a ativação da proteína SHP-1 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1*), uma fosfatase que desfosforila a proteína CK2 (*caseine kinase II*). Quando fosforilada, a CK2 é responsável pela fosforilação da SLK (*Ste20-related kinase*), que atua fosforilando e ativando a RhoA. Portanto, aumento da fração não fosforilada da SLK promove diminuição da ativação da RhoA e conseqüente menor ativação da ROCK (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*) (Bedecs et al., 1997; Cui, 2001; Savoia et al., 2005; Guilluy et al., 2008). A ROCK fosforila a subunidade regulatória MYPT-1 (*Myosin phosphatase target subunit*) da MLCP (*Myosin light-chain phosphatase*), levando a uma inibição da atividade dessa fosfatase, o que aumenta a fosforilação da MLC (*Myosin light-chain*) e gera contração vascular. Portanto, a menor ativação da ROCK diminui a fosforilação da MLC e gera relaxamento vascular. A

ROCK também pode agir fosforilando a CPI-17 (*C-kinase potentiated Protein phosphatase-1 Inhibitor Mr = 17 kDa*), que, quando fosforilada, pode se ligar a MYPT1 inativando a MLCP e, então, menor ativação dessa via contribui para a contração vascular (Kimura et al., 1996). Contudo, essas vias ainda necessitam ser investigadas nos tecidos e modelos em que estudamos.

A angiotensina 1-7 pode ser um dos fatores relaxantes liberados pelo PVAT (Lee et al., 2009). Por isso, fomos ver a participação do receptor Mas no efeito do PVAT. Observamos que o antagonismo do receptor Mas aumentou a resposta contrátil independente da presença do PVAT, diferentemente do que fora observado por Nóbrega e colaboradores (2019), que observaram aumento da vasoconstrição à fenilefrina somente na presença do PVAT. Essas diferenças podem ser devido ao diferente vasoconstritor utilizado, já que a fenilefrina atua somente em receptor  $\alpha_1$  e a noradrenalina atua de forma não seletiva nos receptores adrenérgicos, e à linhagem, sendo que no presente estudo foram utilizados camundongos C57Bl/6 e no de Nóbrega e colaboradores, Balb/c. Além disso, os resultados do presente estudo indicam que o receptor Mas não está envolvido no prejuízo do efeito anticontrátil do PVAT dos camundongos obesos.

Em resumo, nossos resultados indicam que a ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica está prejudicada e que há envolvimento de alteração da sinalização do receptor  $AT_2$ . Vimos também que o prejuízo do efeito anticontrátil do PVAT dos animais obesos não é dependente de alterações na sinalização do NO nem do receptor Mas. Pelo efeito da redução do efeito do PVAT na aorta dos camundongos obesos não ser por diminuição de NO, acreditamos que possa haver uma alteração na via dependente das fosfatases, algo que estamos trabalhando para testar essa hipótese. Além disso, estamos realizando experimentos para estudarmos as vias moleculares envolvidas na disfunção do PVAT, como o  $H_2O_2$  que foi mostrado ser liberado pela ativação do receptor  $AT_2$  (Nóbrega et al., 2019).

Portanto, ainda não é possível saber se este efeito diminuído do PVAT do animal obeso é relacionado a uma diminuição da produção de fatores relaxantes derivados do PVAT ou se os mecanismos de ação anticontrátil não são ativados, pois não há um estímulo suficiente para tal, tendo em vista que em anéis PVAT- dos animais obesos tem uma menor contração do que os anéis PVAT- dos animais controles. Porém, podemos afirmar que a disfunção do PVAT em camundongos

obesos envolve menor participação do receptor AT<sub>2</sub> tendo em vista o que observamos nos animais nocautes e utilizando ferramenta farmacológica.

## 6. CONCLUSÃO

Sumarizando os nossos resultados indicam que:

- 1) Nosso modelo de obesidade é robusto já que mostramos por diversas técnicas seu sucesso;
- 2) A ação anticontrátil do PVAT da aorta torácica está prejudicada em camundongos obesos;
- 3) Os animais obesos apresentam prejuízo da função do PVAT por menor participação do receptor  $AT_2$ ;
- 4) Na ausência do receptor  $AT_2$  não é visto efeito anticontrátil do PVAT da aorta;
- 5) O PVAT de camundongos nocaute obesos aumenta a contração da aorta desses animais;

Podemos então concluir que o receptor  $AT_2$  é essencial para o efeito anticontrátil do PVAT da aorta de camundongos, e que o comprometimento desta função do PVAT em animais obesos é por menor participação desse receptor.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghamohammadzadeh, R et al. Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *Journal Of Vascular Research*, v. 52, n. 5, p.299-305, 2015
- Ali, Q et al. Angiotensin type 2 receptor null mice express reduced levels of renal angiotensin converting enzyme-2/angiotensin (1-7)/Mas receptor and exhibit greater high-fat diet-induced kidney injury. *Journal Of The Renin-angiotensin-aldosterone System*, v. 17, n. 3, p.1-8, ago. 2016
- Bahia, L et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *Bmc Public Health*, v. 12, n. 1, p.1-7, 18 jun. 2012
- Bedecs, K et al. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochemical Journal*, v. 325, n. 2, p.449-454, 15 jul. 1997
- Briones AM et al. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension* 2012; 59: 1069-1078.
- Bruder-Nascimento, T et al. Long Term High Fat Diet Treatment: An Appropriate Approach to Study the Sex-Specificity of the Autonomic and Cardiovascular Responses to Obesity in Mice. *Frontiers In Physiology*, v. 8, p.1-11, jan. 2017.
- Burcelin, R et al. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *American Journal of Physiology-endocrinology And Metabolism*, v. 282, n. 4, p.834-842, abr. 2002
- Bussey, CE et al.  $\beta$ 3-Adrenoceptor stimulation of perivascular adipocytes leads to increased fat cell-derived NO and vascular relaxation in small arteries. *British*

- Journal Of Pharmacology, v. 175, n. 18, p.3685-3698, 10 ago. 2018
- Carey, RM. Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2013; v. 62, n. 5, 818–822.
- Chang, L. et al. Loss of Perivascular Adipose Tissue on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Deletion in Smooth Muscle Cells Impairs Intravascular Thermoregulation and Enhances Atherosclerosis. *Circulation*, v. 126, n. 9, p.1067-1078, ago. 2012.
- Chantemèle, Eric J. Belin de et al. Protein Tyrosine Phosphatase 1B, a Major Regulator of Leptin-Mediated Control of Cardiovascular Function. *Circulation*, v. 120, n. 9, p.753-763, set. 2009
- Chantemele, Eric J. Belin de et al. Impact of Leptin-Mediated Sympatho-Activation on Cardiovascular Function in Obese Mice. *Hypertension*, v. 58, n. 2, p.271-279, jun. 2011.
- Chaar, L. J. et al. High-fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance are associated with an upregulation of CART in the dorsomedial hypothalamus of mice. *Physiological Reports*, v. 4, n. 11, p.1-15, jun. 2016.
- Chatterjee TK et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes influence of high-fat feeding. *Circ Res* 2009; 104: 541-549.
- Choi, MS et al. High-fat diet decreases energy expenditure and expression of genes controlling lipid metabolism, mitochondrial function and skeletal system development in the adipose tissue, along with increased expression of extracellular matrix remodeling - and inflammation-related genes. *British Journal Of Nutrition*, v. 113, n. 06, p.867-877, mar. 2015
- Craigie, David. Case of Inflammation of the Adipose Tissue, Forming the Sheath of the Carotid Artery, Followed by Erosion and Perforation of the Arterial Tissue and

- Fatal Hemorrhage; with Some Remarks on the Peculiarities of Inflammation of the Adipose Tissue. *Edinburgh Medical And Surgical Journal*, Edinburgh, v. 133, n. 48, p.396-413, out. 1837.
- Cui, T. Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT2 receptor-mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cell. *Cardiovascular Research*, v. 49, n. 4, p.863-871, mar. 2001
- Cummins, PM. A new addition to the renin-angiotensin peptide family: ProAngiotensin-12 (PA12). *Cardiovascular Research* 2009; v. 82, n. 1, 7–8.
- Davel, AP. et al. Increased Vascular Contractility and Oxidative Stress in  $\beta$ 2-Adrenoceptor Knockout Mice: The Role of NADPH Oxidase. *Journal Of Vascular Research*, v. 49, n. 4, p.342-352, 2012
- De Souza C.T., Araújo E.P., Prada P.O., Saad M.J.A., Velloso L.A. Short-term inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  expression reverses diet-induced diabetes mellitus and hepatic steatosis in mice. *Diabetologia* 48: 1860-1871, 2005.
- Dumas, ME et al. Microbial-Host Co-metabolites Are Prodromal Markers Predicting Phenotypic Heterogeneity in Behavior, Obesity, and Impaired Glucose Tolerance. *Cell Reports*, v. 20, n. 1, p.136-148, jul. 2017. Elsevier BV
- Eringa EC et al. Regulation of vascular function and insulin sensitivity by adipose tissue: focus on perivascular adipose tissue. *Microcirculation* 2007; 14: 389–402.
- Fang, L et al. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *Journal Of Hypertension*, v. 27, n. 11, p.2174-2185, nov. 2009.
- Fernandez-Alfonso MS et al. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 1-8.



- Fernandez-Sánchez A et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Science* 2011; 12: 3117-32.
- Fésüs G et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Circ Res* 2007; 75: 719-727.
- Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinic associations. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: 1-15.
- Fitzgibbons TP et al. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H1425-H1437.
- Fontaine, KR. et al. Years of Life Lost Due to Obesity. *Jama*, v. 289, n. 2, p.1-7, 8 jan. 2003. American Medical Association
- Fox CS et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart study. *Circulation* 2007; 116: 39-48.
- Fuster JJ et al. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. *Circ Res* 2016; 118: 1786-1807.
- Gallou-Kabani, C et al. C57BL/6J and A/J Mice Fed a High-Fat Diet Delineate Components of Metabolic Syndrome. *Obesity*, v. 15, n. 8, p.1996-2005, ago. 2007
- Gálvez B et al. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1297-1302.
- Gálvez-Prieto B et al. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between White and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol* 2008; 197: 55-64.

- Gálvez-Prieto B et al. Anticontractile effect of perivascular adipose tissue and leptin are reduced in hypertension. *Front Pharmacol* 2012; 3: 1–8.
- Gao Y-J et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 363-373.
- Gao Y-J et al. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obes Res* 2005; 13: 687-692.
- Gao Y-J et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 323–331.
- Gao Y-J. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 2185-2192.
- Gil-Ortega M et al. Adaptive nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. *Endocrinology* 2010; 151: 3299–3306.
- Gil-Ortega, M et al. Imbalance between Pro and Anti-Oxidant Mechanisms in Perivascular Adipose Tissue Aggravates Long-Term High-Fat Diet-Derived Endothelial Dysfunction. *Plos One*, v. 9, n. 4, p.1-10, 23 abr. 2014
- Greenstein, AS. et al. Local Inflammation and Hypoxia Abolish the Protective Anticontractile Properties of Perivascular Fat in Obese Patients. *Circulation* v. 119, n. 12, p.1661-1670, 31 mar. 2009
- Guilluy, C et al. Ste20-Related Kinase SLK Phosphorylates Ser188 of RhoA to Induce Vasodilation in Response to Angiotensin II Type 2 Receptor Activation. *Circulation Research*, v. 102, n. 10, p.1265-1274, 23 maio 2008
- Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 332-341.
- Hagihara, GN. et al. Upregulation of ERK1/2-eNOS via AT2 Receptors Decreases the

- Contractile Response to Angiotensin II in Resistance Mesenteric Arteries from Obese Rats. *Plos One*, v. 9, n. 8, p.1-10, 29 ago. 2014
- Haberka M, Gasior Z. Carotid extra-media thickness in obesity and metabolic syndrome: A novel index of perivascular adipose tissue, extra-media thickness in obesity and metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2015; 239: 169-177.
- Hammond, R; Levine, R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes, Metabolic Syndrome And Obesity: Targets and Therapy*, p.285-295, ago. 2010
- Hashimoto CM. Tratamento crônico com losartana corrige a disfunção do tecido adiposo perivascular em camundongos obesos. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.
- Hiyoshi, H. et al. Angiotensin Type 2 Receptor-Mediated Phosphorylation of eNOS in the Aortas of Mice With 2-Kidney, 1-Clip Hypertension. *Hypertension*, v. 45, n. 5, p.967-973, abr. 2005.
- Higuchi S, et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)*. 2007; 112:417-28
- Houben AJ et al. Perivascular Fat and the Microcirculation: Relevance to Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiovasc Risk Rep* 6: 80-90, 2011.
- Hrenak, J.; Paulis, L.; Simko, F. Angiotensin A/Alamandine/MrgD axis: Another clue to understanding cardiovascular pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 7, 2016.
- Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*. 1995;26(377):748-50

- Inada AC. Componentes do sistema renina-angiotensina no tecido adiposo perivascular da aorta torácica e do leito mesentérico: alterações promovidas pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.
- Jo, J et al. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *Plos Computational Biology*, v. 5, n. 3, p.1-11, 27 mar. 2009
- Kimura, K. et al. Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). *Science*, v. 273, n. 5272, p.245-248, 12 jul. 1996
- Kitahara, CM. et al. Association between Class III Obesity (BMI of 40–59 kg/m<sup>2</sup>) and Mortality: A Pooled Analysis of 20 Prospective Studies. *Plos Medicine*, v. 11, n. 7, p.1-14, 8 jul. 2014
- Lautner, RQ et al. Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. *Circulation Research* 2013, v. 112, n. 8, 1104–1111..
- Leal VO, Mafra D. Adipokines in obesity. *Cin Chim Acta* 2013; 419: 87-94.
- Lee RM et al. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J Hypertens* 2009; 27: 782–790.
- Lee Y-C et al. Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. *Circulation* 2011; 124: 1160-1171.
- Lin, S et al. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *International Journal Of Obesity*, v. 24, n. 5, p.639-646, maio 2000. Springer Nature
- Löhn M et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 2002; 16: 1057-1063.

- Lu C et al. Mechanisms for perivascular adipose tissue-mediated potentiation of vascular contraction to perivascular neuronal stimulation: the role of adipocyte derived angiotensin II. *Eur J Pharmacol* 2010; 634: 107-112.
- Lung, T et al. Impact of overweight, obesity and severe obesity on life expectancy of Australian adults. *International Journal Of Obesity*, v. 43, n. 4, p.782-789, 3 out. 2018
- Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012; Chapter 5:Unit 5.61.
- Ma, Liqun et al. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Hypertension Research*, v. 33, n. 5, p.446-453, 26 fev. 2010.
- Maenhaut N, Van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med* 2011; 16: 9-25.
- Marchesi, C et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Perivascular Adipose Oxidative Stress and Inflammation Contribute to Vascular Dysfunction in a Rodent Model of Metabolic Syndrome. *Hypertension*, v. 54, n. 6, p.1384-1392, out. 2009.
- Mark, Allyn et al. Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *Journal Of Hypertension*, v. 12, n. 17, p.1949-1953, dez. 1999
- Meijer RI et al. Perivascular adipose tissue and its role in type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Curr Diab Rep* 2011; 11: 211-217.
- Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharm* 2012; 165: 643–658.
- Moraes, P. L. et al. Cardiovascular effects of small peptides of the renin angiotensin

- system. *Physiological Reports*, v. 5, n. 22, p. e13505, 2017.
- Ng, M et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, v. 384, n. 9945, p.766-781, ago. 2014
- Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system – focusing on the vascular system. *Peptides* 2011; 32: 2141-2150.
- Nóbrega, N et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide induce anticontractile effect of perivascular adipose tissue via renin angiotensin system activation. *Nitric Oxide*, v. 84, p.50-59, mar. 2019
- Ozen G et al. Control of human vascular tone by prostanoids derived from perivascular adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2013; 107: 13-17.
- Peluso, AA et al. Identification of protein phosphatase involvement in the AT 2 receptor-induced activation of endothelial nitric oxide synthase. *Clinical Science*, v. 132, n. 7, p.777-790, 14 mar. 2018
- Police SB et al. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II – induced abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1458-1464.
- Raizada V et al. Intracardiac and intrarenal renin–angiotensin systems: mechanisms of cardiovascular and renal effects. *J Investig Med* 2007; 55: 341–359.
- Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, De Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem*. 15;401(2):318-20, 2010.
- Sampaio, WO et al. Angiotensin-(1-7) Through Receptor Mas Mediates Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation via Akt-Dependent Pathways. *Hypertension*,v.

49, n. 1, p.185-192, nov. 2006.

Savoia, C et al. Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal Of Hypertension*, v. 23, n. 5, p.1037-1045, maio 2005

Schleifenbaum J et al. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J Hypertens* 2010; 28: 1875-1882.

Schmid, GM. et al. Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. *Proteomics*, v. 4, n. 8, p.2270-2282, ago. 2004

Schreyer, SA. et al. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 136, n. 1, p.17-24, jan. 1998.

Shum, M et al. Angiotensin II type 2 receptor promotes adipocyte differentiation and restores adipocyte size in high-fat/high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. *American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism*, v. 304, n. 2, p.197-210, 15 jan. 2013

Siegel-Axel DI, Häring HU. Perivascular adipose tissue: an unique fat compartment relevant for the cardiometabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 2016; 17: 51-60.

Silva RNO. Efeito protetor do baço contra a resposta inflamatória do tecido adiposo perivascular do leito mesentérico de camundongos obesos. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2018.

Singh, KD; Karnik, SS. Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications. *J Cell Signal.*, v. 2, n. 1, p.1-8, jun. 2016

Soares, AG. Obesidade induz alterações artéria-específica: avaliação da função

endotelial e do fenótipo das células musculares lisas. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Soares, AG; Carvalho, MHC; Akamine, EH. Obesity Induces Artery-Specific Alterations: Evaluation of Vascular Function and Inflammatory and Smooth Muscle Phenotypic Markers. *Biomed Research International*, v. 2017, p.1-10, 2017

Soltis E, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens* 1991; 13: 277-296.

Steckelings, U et al. Impact of AT2-receptor stimulation on vascular biology, kidney function, and blood pressure. *Integrated Blood Pressure Control*, p.153-161, nov. 2013

Sundaram, S; Yan, n. Time-restricted feeding reduces adiposity in mice fed a high-fat diet. *Nutrition Research*, v. 36, n. 6, p.603-611, jun. 2016

Sysoeva, VY. et al. Local angiotensin II promotes adipogenic differentiation of human adipose tissue mesenchymal stem cells through type 2 angiotensin receptor. *Stem Cell Research*, v. 25, p.115-122, dez. 2017

Victorio, JA. et al. Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. *Frontiers In Physiology*, v. 7, p.1-10, 12 jul. 2016

VIGITEL – Vigilância De Fatores De Risco E Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde, 2017

Verlohren S et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 2004; 44: 271-276.

Wang Y et al. A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence. *Cancer Causes Control* 2008; 19: 783-



792.

Williams, Td et al. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology*, v. 30, n. 10, p.769-778, out. 2003

World Health Organization. 2017,  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

Xia, N et al. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice Significance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*,v. 36, n. 1, p.78-85, nov. 2015.

Yu, L. et al. Angiotensin-(1-5), an active mediator of renin-angiotensin system, stimulates ANP secretion via Mas receptor. *Peptides*, v. 86, p. 33–41, 201

Yvan-Charvet, L. et al. Deletion of the Angiotensin Type 2 Receptor (AT2R) Reduces Adipose Cell Size and Protects From Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, v. 54, n. 4, p.991-999, 25 mar. 2005