

**PAULA RODRIGUES DE BARROS**

**REATIVIDADE VASCULAR E INFLUÊNCIA DO TECIDO ADIPOSEO  
PERIVASCULAR (PVAT) NO MODELO DE ENVELHECIMENTO  
SAMP-8**

Relatório apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

**PAULA RODRIGUES DE BARROS**

**REATIVIDADE VASCULAR E INFLUÊNCIA DO TECIDO ADIPOSEO  
PERIVASCULAR (PVAT) NO MODELO DE ENVELHECIMENTO  
SAMP-8**

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Paula Rodrigues de Barros

Título da Dissertação: Reatividade vascular e influência do Tecido Adiposo Perivascular (PVAT) no modelo de envelhecimento SAMP-8

Orientador: Prof(a) Dra. Eliana Hiromi Akamine

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, 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: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Caracterização das respostas vasculares e da função do tecido adiposo perivascular no modelo de envelhecimento SAMP8*", registrado sob o protocolo nº **82/2017**, 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 **04/09/2017** 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: *Paula Rodrigues de Barros (Pós-graduando), Bruno Vinicius Duarte Marques (Pós-graduando), Vanessa de Paula Miyoshi (Iniciação científica)*

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 [ww2.icb.usp.br/icb/ceua](http://ww2.icb.usp.br/icb/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 "*Characterization of vascular responses and perivascular adipose tissue function in the SAMP8 aging model*", protocol nº **82/2017**, 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 **9/4/2017** 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: *Paula Rodrigues de Barros (Graduate Student), Bruno Vinicius Duarte Marques (Graduate Student), Vanessa de Paula Miyoshi (Undergraduate 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>	SAMP8	Macho/male	3, 6, 8, 10 meses/months	320
	SAMR1	Macho/male	3, 6, 8, 10 meses/months	320
	SAMP8	Fêmea/female	3 meses/months	80
	SAMR1	Fêmea/female	3 meses/months	80

São Paulo, 05 de setembro de 2017.

  
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Dedicatória

*In memoriam* ao meu vizinho.

À minha família, em especial a meu querido pai, vizinha, meus queridos  
tios e minha mãe.

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas passaram por mim durante a pós-graduação e para todos que me acompanharam nesta fase da minha vida deixo aqui meu muito obrigada! O conhecimento que cada um de vocês me deu não caberia nesta dissertação.

Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine. Você é um exemplo de pesquisadora que levarei para minha carreira acadêmica. Agradeço por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me recebido como sua aluna. Obrigada pelo incentivo ao longo da pós-graduação e por ter me ajudado em todos os momentos de minha formação.

Profa. Dra. Ana Paula Dantas do *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer*, Universidade de Barcelona. Obrigada por ter gentilmente contribuído com este trabalho cedendo as matrizes de camundongos SAMP-8 e SAMR-1 utilizados nos experimentos.

Profa. Dra. Rita Tostes e o seu laboratório, por colaborar na realização dos experimentos de determinação do conteúdo tecidual de ânion superóxido pelo método de quimioluminescência da lucigenina.

Muitos professores contribuíram para o meu amadurecimento científico e conhecimento durante minha pós-graduação o qual externo meus agradecimentos. Aos senhores (as) o meu respeito e admiração.

Meu muito obrigada a equipe do Laboratório de Biologia vascular e Hipertensão: Dra. Renée de Nazaré Oliveira da Silva, Msc. Carolina Midori Hashimoto, Dra. Cinthya Echem, Dra. Vanessa Oliveira, Msc. Aline Carla Inada, Maria Aparecida de Oliveira, Sônia Leite, Marta Rodrigues, Bruno Marques, Dr. Stephen Rodrigues, Vanessa Miyoshi e Rosângela dos Santos-Eicheler.

Em especial a meus colaboradores neste trabalho: Renée e Tiago, que dedicaram seu tempo revisando e contribuindo para realização deste trabalho. Vocês têm minha admiração como pesquisadores e fico muito feliz de tê-los como amigos nessa jornada acadêmica.

A pós-graduação do Departamento de Farmacologia e seu suporte administrativo.

### ***Agradecimentos especiais***

A meu Pai e Dinda que são meus exemplos de professores, tenho muito orgulho de vocês! E toda nossa família por sempre ter apoiado e incentivado uns aos outros em seus estudos. Ficar longe de vocês é meu maior sacrifício!

Ao meu companheiro de carreira, de alegrias e sonhos, André Teles, você fez da pós-graduação e da vida em SP mais leve e tranquila! Meu muito obrigada por todo apoio e carinho. Esta conquista que é a conclusão de uma pós-graduação não seria a mesma sem você!

A minha família em SP, a casa mais amor do Butantã: Martina, Mathias, André e (por que não?) Giovana. Vocês são meu maior presente dessa mudança de vida, muito obrigada por todo o companheirismo, amadurecimento e conhecimento que vocês me deram! Guardarei a amizade de cada um.

A “família fármaco” amigos desde a “Pensão do Ratinho” até o “Bandex”. Obrigada por todas conversas e almoços com vocês, nem que fosse só pra lamentar o experimento que deu errado ou comemorar aquele resultado que você tanto espera! Obrigada por me mostrar que não só de “ciência” vive o pós-graduando e que a união nós deixa mais fortes.

As minhas irmãs de coração Jules e Karol por serem as melhores amigas que eu poderia ter e aguentarem toda a minha ausência e correria durante esta fase, mas sempre me recebendo com um ombro amigo e uma alegria de viver contagiante, mesmo à distância! Obrigada meninas!

A aluna Paula Rodrigues de Barros e a orientadora Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine agradecem a Fundação de Amparo a 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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos na modalidade doutorado, fundamental para o desenvolvimento inicial deste estudo. Código de financiamento 001



## RESUMO

Barros P. R. Reatividade vascular e influência do Tecido Adiposo Perivascular (PVAT) no modelo de envelhecimento SAMP-8. 2019. 74f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

O envelhecimento promove alterações vasculares e aumenta o risco para doenças cardiovasculares. O PVAT é capaz de secretar fatores que modulam a função vascular de maneira parácrina, mas a influência do envelhecimento na função do PVAT ainda é pouco compreendida. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reatividade vascular e a influência do PVAT da aorta torácica de camundongos SAMP-8 e seus controles SAMR-1 machos. Realizamos curvas concentração-resposta para acetilcolina (ACH), nitroprussiato de sódio (NPS) e noradrenalina (NOR) em anéis de aorta torácica, na ausência (PVAT-) e presença (PVAT+) de PVAT, de camundongos aos 3 meses de idade. Para avaliar os mecanismos envolvidos na contração, realizamos curvas na ausência do endotélio ou na presença de inibidor da sintase de óxido nítrico (NOS) ou incubadas com as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A expressão proteica da eNOS total e fosforilada em serina<sup>1177</sup> (p-eNOS), CAT, Cu/Zn-SOD e Mn-SOD, e a geração de ânion superóxido foram avaliadas na aorta torácica e PVAT. A resposta máxima (Rmax) induzida pela ACH foi reduzida em anéis PVAT- e PVAT+ de SAMP-8 em relação aos respectivos anéis de SAMR-1, enquanto a sensibilidade ao NPS foi reduzida apenas em anéis PVAT+. Em anéis PVAT-, a Rmax à NOR foi aumentada em SAMP-8 em relação aos SAMR-1. A Rmax à NOR foi reduzida em anéis PVAT+ em relação aos anéis PVAT- de SAMP-8, de modo que não houve diferença nos anéis PVAT+ entre as duas linhagens. A remoção do endotélio e a inibição da NOS aumentaram a Rmax à NOR em anéis PVAT- e PVAT+ de SAMR-1, sendo que em SAMP-8 houve aumento apenas nos anéis PVAT+. O conteúdo proteico da eNOS total em aorta torácica e PVAT não foi diferente entre as duas linhagens. A p-eNOS em aorta sem estímulo com NOR foi semelhante entre as duas linhagens, mas, sob estímulo, a p-eNOS foi reduzida em aorta de SAMP-8 em relação aos SAMR-1. Na condição basal, a p-eNOS foi reduzida no PVAT de SAMP-8 em relação aos SAMR-1. O estímulo com NOR reduziu a p-eNOS no PVAT de SAMR-1, mas não de SAMP-8, em relação à condição basal. A incubação com CAT, mas não com SOD, aumentou a Rmax à NOR em anéis PVAT+ de SAMR-1. SOD e CAT reduziram a Rmax à NOR em anéis PVAT-, mas não em PVAT+, de SAMP-8. Não houve diferença na expressão das enzimas antioxidantes na aorta e PVAT entre as duas linhagens. Na aorta, não houve diferença na condição basal, mas houve aumento da geração de ânion superóxido com estímulo de NOR em SAMP-8 em relação aos SAMR-1. No PVAT, a geração de ânion superóxido na condição basal foi aumentada em SAMP-8. O estímulo com NOR aumentou a geração de ânion superóxido no PVAT de SAMR-1, mas não de SAMP-8, de modo que não houve diferença entre as linhagens. Nossos resultados mostram que aos 3 meses de idade camundongos SAMP-8 machos apresentam disfunção vascular, que envolve redução da disponibilidade de NO endotelial e desequilíbrio oxidativo, mas a ação anticontrátil do PVAT aparece como um mecanismo compensatório, sendo que NO não parece ter participação nessa ação.

## ABSTRACT

BARROS P. R. Vascular reactivity and the influence of the Perivascular Adipose Tissue (PVAT) in SAMP-8 model. 2019. 74p. Dissertation (Master in Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.

Aging promotes vascular changes and increases the risk for cardiovascular disease. PVAT is able to secrete factors that modulate vascular function in a paracrine way, but the influence of aging on PVAT function is still poorly understood. The objective of this work was to evaluate the vascular reactivity and the influence of PVAT of the thoracic aorta of male SAMP-8 mice and their controls SAMR-1. We performed concentration-response curves for acetylcholine (ACH), sodium nitroprusside (NPS) and noradrenaline (NOR) in thoracic aorta rings, in the absence (PVAT-) and presence (PVAT+) of PVAT from mice at 3 months of age. To evaluate the mechanisms involved in the contraction, we performed curves in the absence of the endothelium or in the presence of nitric oxide synthase inhibitor (NOS) or the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Protein expression of total and phosphorylated eNOS in serine<sup>1177</sup> (p-eNOS), CAT, Cu/Zn-SOD and Mn-SOD, and generation of superoxide anion were evaluated in the thoracic aorta and PVAT. The maximum response (MaxR) induced by ACH was reduced in PVAT- and PVAT+ rings of SAMP-8 in relation to the respective SAMR-1 rings, while the sensitivity to NPS was reduced only in PVAT+ rings. In PVAT- rings, MaxR to NOR was increased in SAMP-8 when compared to SAMR-1. The MaxR to NOR was reduced in PVAT+ rings when compared to the PVAT- rings of SAMP-8, thus there was no difference in the PVAT+ rings between the strains. Endothelial removal and inhibition of NOS increased the MaxR to NOR in PVAT- and PVAT+ rings of SAMR-1, whereas in SAMP-8 there was increase only in PVAT+ rings. The protein content of total eNOS in the thoracic aorta and PVAT was not different between the two strains. The p-eNOS in the aorta without NOR stimulation was similar between the two strains, but under stimulation, the p-eNOS was reduced in the aorta of SAMP-8 when compared to the SAMR-1. At baseline, p-eNOS was reduced in the PVAT of SAMP-8 in relation to the SAMR-1. NOR stimulation reduced p-eNOS in the PVAT of SAMR-1, but not of SAMP-8, in relation to the baseline condition. Incubation with CAT, but not with SOD, increased the MaxR to NOR in PVAT+ rings of SAMR-1. SOD and CAT reduced the MaxR to NOR in PVAT-, but not in PVAT+ rings of SAMP-8. There was no difference in the expression of the antioxidant enzymes in the aorta and PVAT between the two strains. In the aorta, there was no difference in the baseline condition, but there was an increase in superoxide anion generation with NOR stimulus in SAMP-8 compared to the SAMR-1. In PVAT, the generation of superoxide anion at baseline was increased in SAMP-8. The NOR stimulation increased the superoxide anion generation in the PVAT of SAMR-1, but not of SAMP-8, thus there was no difference between the strains. Our results show that at 3 months of age male SAMP-8 mice present vascular dysfunction, which involves reduction of the availability of endothelial NO and oxidative imbalance, but the anticontractile action of PVAT appears as a compensatory mechanism, and NO does not seem to have a participation in this action.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMP</b> Adenosina monofosfato	<b>H<sub>2</sub>S</b> Sulfeto de Hidrogênio
<b>AMPK</b> Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato	Perivascular
<b>ANOVA</b> Análise de variância	<b>i.p</b> Intraperitoneal
<b>BH<sub>4</sub></b> tetrabiopterina	<b>INDO</b> Indometacina
<b>BSA</b> Albumina de Soro Bovino	<b>KCL</b> Cloreto de Potássio
<b>Ca<sup>2+</sup>-CAM</b> cálcio-calmodulina	<b>L-NAME</b> N(ω)-nitro-L-arginina metil éster
<b>CAT</b> Catalase	<b>L-NMMA</b> L-NG-monomethyl Arginine citrate
<b>CMLs</b> Células Musculares Lisas	<b>NPS</b> Nitroprussiato de Sódio
<b>COX</b> enzima ciclooxigenase	<b>NO</b> Óxido Nítrico
<b>DCV</b> Doenças cardiovasculares	<b>NOS</b> NO sintase
<b>EDTA</b> Ácido etilenodiamino tetra-acético	<b>PGH<sub>2</sub></b> prostaglandina H <sub>2</sub>
<b>EDCF</b> Fatores Contráteis Derivados do Endotélio	<b>PGF<sub>2</sub>α</b> prostaglandina F <sub>2</sub> α
<b>EDHF</b> Fatores Hiperpolarizantes Derivados do Endotélio	<b>PKA</b> proteína quinase A
<b>eNOS</b> Óxido Nítrico Sintase Endotelial	<b>PKC</b> proteína quinase C
<b>EDRF</b> Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio	<b>PVAT</b> Tecido Adiposo Perivascular
<b>EROs</b> Espécies Reativas de Oxigênio	<b>SAMP-8</b> Senescence Accelerated Mouse Prone – 8
<b>Fe<sup>2+</sup></b> íon ferro II (ferroso)	<b>SAMR-1</b> Senescence Accelerated Mouse Resistent – 1
<b>GMPc</b> Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico	<b>SOD</b> superóxido desmutase
	<b>TXA<sub>2</sub></b> Tromboxano A <sub>2</sub>
	<b>WHO</b> World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS, ILUSTRAÇÕES, EQUAÇÕES E TABELAS

- Figura 1** - Aumento da população mundial em relação a 2000, por ampla faixa etária, 2000-2050.....2
- Figura 2** - Imagem representativa da estrutura e composição arterial.....4
- Figura 3** - Efeitos do envelhecimento arterial na composição e estrutura das camadas vasculares.....9
- Figura 4** - Possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida pelo envelhecimento.....12
- Figura 5** - Massa corpórea ao longo de 9 semanas.....26
- Figura 6** - Índice de Lee, massa relativa dos depósitos de gorduras retroperitoneal, periepididimal e interscapular, massa do gastrocnêmio e massa do ventrículo esquerdo.....27
- Figura 7** - Glicemia e concentração plasmática de colesterol total e triglicerídeos...  
.....28
- Figura 8** - Curva concentração-resposta, resposta máxima e sensibilidade para acetilcolina.....29
- Figura 9** - Curva concentração-resposta resposta máxima e sensibilidade para nitroprussiato de sódio.....30
- Figura 10** - Curva concentração-resposta, resposta máxima e sensibilidade para noradrenalina.....32
- Figura 11** - Curva concentração-resposta, resposta máxima e sensibilidade para noradrenalina em anéis de aorta torácica, na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio e com (+) ou sem (-) tecido adiposo perivascular (PVAT) intacto e incubados com inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME).....34
- Figura 12** - Porcentagem de aumento promovido pelo inibidor da síntese do óxido nítrico (L-NAME) nos anéis da aorta torácica, na presença de endotélio e com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivascular (PVAT).....35
- Figura 13** - Conteúdo proteico da eNOS total e fosforilada em serina1177 aorta e PVAT, sem (basal) e com estímulo (estimulado) com noradrenalina.....36
- Figura 14** - Curva concentração-resposta, resposta máxima e sensibilidade para

noradrenalina em anéis de aorta torácica incubados com superóxido dismutase (SOD) ou não (controle).....38

**Figura 15** - Curva concentração-resposta, resposta máxima e sensibilidade para noradrenalina em anéis de aorta torácica incubados com catalase (CAT) ou não (controle).....39

**Figura 16** - Conteúdo proteico das isoformas da superóxido dismutase (SOD), SOD-Cu/Zn e SOD-Mn, e da catalase e geração de ânion superóxido na condição basal e com estímulo de noradrenalina em aortas e PVAT.....41

**Figura 17** - Curva concentração-resposta, resposta máxima e sensibilidade para noradrenalina em anéis de aorta torácica incubados com indometacina (INDO) ou não (controle).....42

**Tabela 1** - Anticorpos utilizados para *Western blot*.....25

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Envelhecimento e as doenças cardiovasculares.....	1
1.2 Sistema vascular.....	3
1.2.1 Envelhecimento vascular.....	8
1.3 Tecido Adiposo Perivascular.....	12
1.4 SAMP-8 Modelo murino de estudo em envelhecimento.....	16
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>19</b>
2.1 Delineamento experimental.....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
3.1 Animais.....	20
3.2 Caracterização.....	20
3.2.1 Evolução ponderal e consumo de ração, calorias e água.....	20
3.2.2 Glicemia, comprimento naso-anal e obtenção do sangue e tecidos.....	20
3.2.3 Índice de Lee, conteúdo de gordura e massa magra.....	21
3.2.4 Concentração plasmática de colesterol total e triglicérides.....	21
3.3 Reatividade vascular.....	21
3.4 Western blotting.....	23
3.4.1 Coleta dos tecidos.....	23
3.4.2 Western blotting.....	23
3.5 Determinação do conteúdo tecidual de ânion superóxido pelo método de quimioluminescência da lucigenina.....	25
3.6 Análise estatística.....	25
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
4.1 Caracterização do modelo experimental.....	26
4.1.1 Evolução ponderal, consumo de água e ração.....	26
4.1.2 Índice de Lee, massa dos depósitos de gordura, massa magra e do ventrículo esquerdo.....	27
4.1.3 Parâmetros bioquímicos.....	28
4.2 Relaxamento dependente do endotélio e influência do PVAT em camundongos com 3 meses de idade.....	28
4.3 Relaxamento ao doador de NO e influência do PVAT em camundongos com 3 meses de idade.....	29

4.4 Contração induzida por agonista adrenérgico e influência do PVAT em camundongos com 3 meses de idade.....	31
4.4.1 Modulação da contração pelo endotélio e NO em anéis sem e com PVAT.....	32
4.5 Conteúdo proteico de eNOS e efeito do estímulo por noradrenalina sobre a fosforilação da eNOS em aorta torácica e PVAT.....	35
4.5.1 AORTA.....	35
4.5.2 PVAT.....	35
4.6 Modulação da contração pelas EROs em anéis sem e com PVAT.....	37
4.7 Expressão das enzimas SOD e catalase e geração de ânion superóxido em aorta torácica e PVAT de camundongos de 3 meses de idade.....	40
4.8 Modulação da contração pelos produtos da COX em anéis sem e com PVAT.....	40
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## 1. Introdução

### 1.1. Envelhecimento e as doenças cardiovasculares

*“Viver é envelhecer, nada mais.”*

(Simone de Beauvoir)

O envelhecimento é um processo inevitável, universal, cumulativo, irreversível, não patológico do declínio da capacidade funcional dos sistemas orgânicos, fazendo com que o organismo perca a capacidade de responder ao estresse do meio ambiente com o avançar da idade, aumentando o risco de doenças e a possibilidade de morte (OMS, 2015). Entretanto, estabelecer um conceito de envelhecimento em sistemas biológicos é complexo, uma vez que é um processo generalizado que envolve diversos programas biológicos (Kovacic *et al.*, 2011).

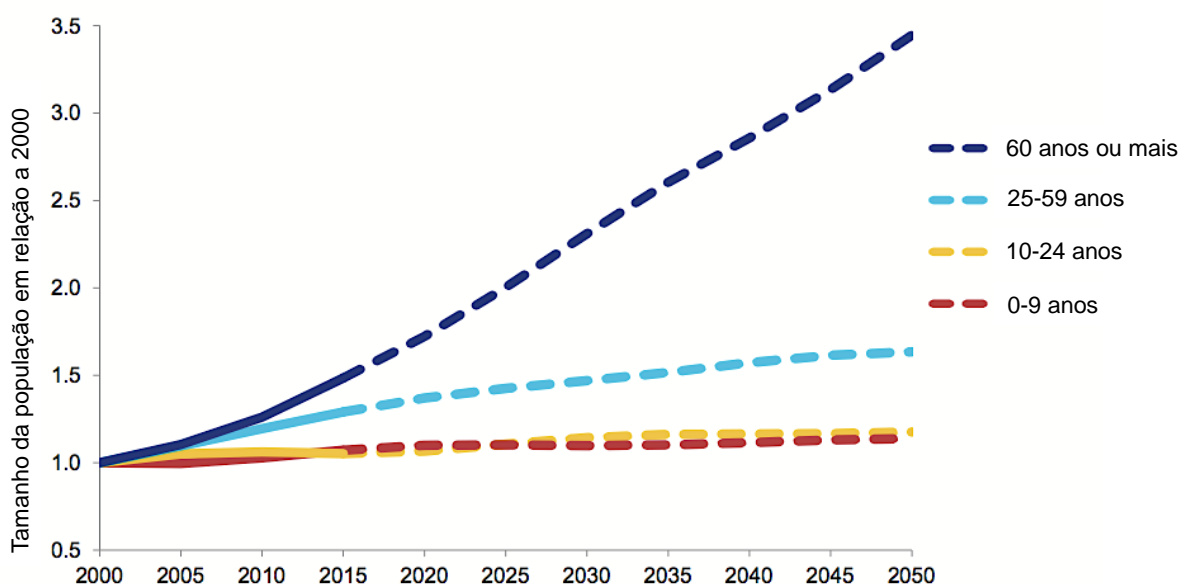
Teorias pré-existentes baseadas na biologia evolutiva deram origem ao estudo do envelhecimento há 30 anos. A teoria evolucionista afirmava que o envelhecimento era um subproduto inevitável das regras da seleção natural e não um processo regulado passível de estudo científico (muito menos de intervenção) (Williams, 1957 *apud* Kirkwood, 2005). Posteriormente, no final do século XX foi observado que as taxas de envelhecimento eram drasticamente diferentes, mesmo dentro das mesmas espécies, e que ao reduzirmos a ingestão de alimentos por uma quantidade específica (em camundongos, isso equivale a 30-40% abaixo da *ad libitum*), podia-se estender o tempo médio e máximo de vida de uma ampla variedade de organismos (Koubova e Guarente, 2003). Assim, embora o próprio envelhecimento seja inevitável, a taxa de envelhecimento pode ser regulada.

Recentemente, em uma revisão, López-Otín e colaboradores (2013) identificaram e categorizaram as características celulares e moleculares do envelhecimento, propondo ao todo nove marcadores que poderiam, em conjunto, determinar o fenótipo do envelhecimento; sendo eles: instabilidade genômica, encurtamento de telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, detecção inadequada de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e comunicação intercelular alterada. Esses processos estão inter-relacionados, de modo que o envelhecimento não é o resultado do mau funcionamento de um único parâmetro, mas sim uma combinação de mudanças



moleculares, que com a progressão do envelhecimento, culmina com o surgimento de doenças relacionadas à idade, como aterosclerose, câncer, doença de Alzheimer e Parkinson, dentre outras que alteram a homeostase e reduzem a qualidade de vida (da Costa *et al.*, 2016; Lees *et al.*, 2016).

A população idosa, acima de 60 anos, está crescendo de forma exponencial e estima-se que em 2015 havia 48% a mais de pessoas com 60 anos ou mais em todo o mundo do que havia em 2000 e, até 2050, o número de pessoas mais velhas deve triplicar em relação ao ano 2000 (**Figura 1**) (United Nations, 2015). Portanto, esse aumento da população idosa promoverá aumento também dos problemas e custos com a saúde, pois, como mencionado anteriormente, o envelhecimento é fator de risco para várias doenças.



**Figura 1** - Aumento da população mundial em relação a 2000, por ampla faixa etária, 2000-2050. Adaptado de: Nações Unidas (2015). Perspectivas da População Mundial: a Revisão de 2015.

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo em ambos os sexos, sendo que, em países mais pobres, essas mortes tendem a acontecer de maneira mais precoce do que em países ricos (Organização Pan-Americana de Saúde, 2017). No Brasil, as doenças do aparelho circulatório apresentam o padrão mundial e são uma das principais causas de mortes no país (Ministério da Saúde, 2016a). A partir dos 50 anos de idade o número de mortes por doenças do aparelho circulatório dobra em

comparação com os indivíduos aos 40 anos de idade em todos os estados (Ministério da Saúde, 2016b). Dentre as regiões brasileiras, a região sudeste destaca-se apresentando 47% das mortes por doenças do aparelho circulatório, sendo o estado de São Paulo correspondente a 51% desse total (Ministério da Saúde, 2016b).

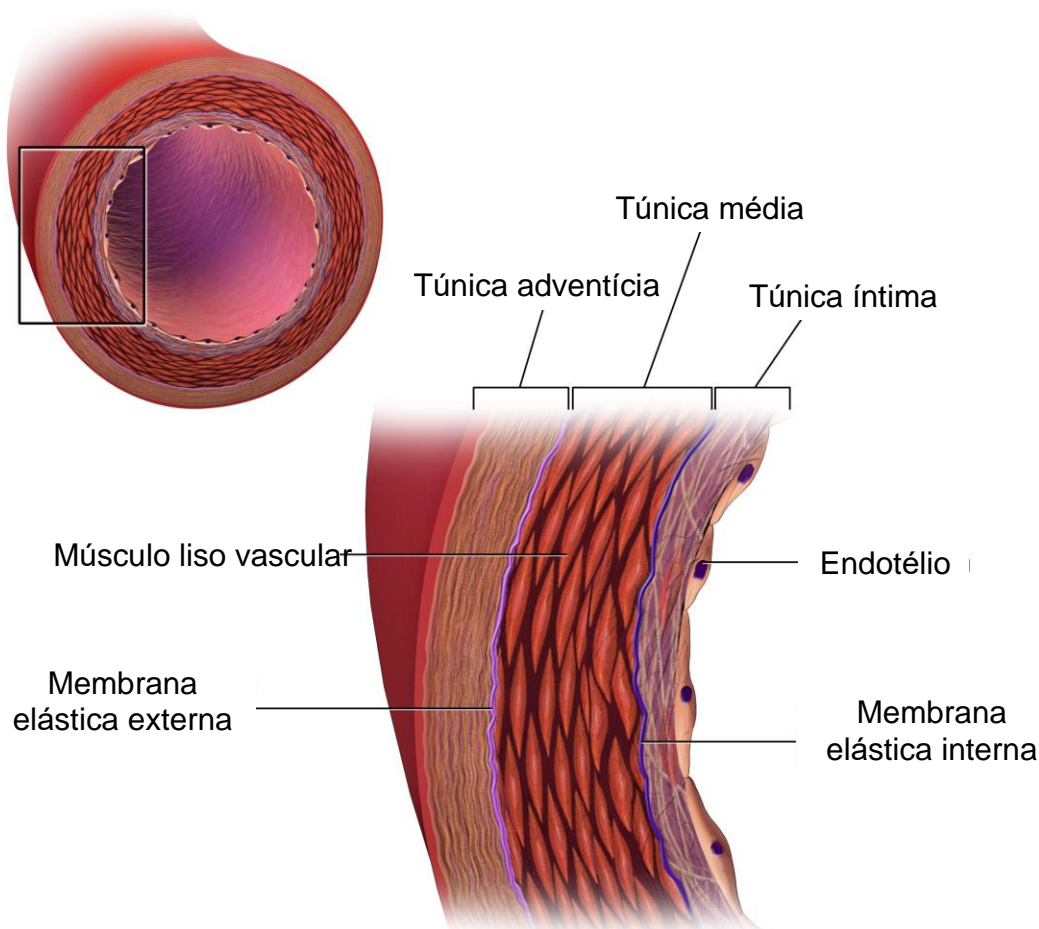
O envelhecimento continua sendo o mais forte fator de risco para DCV (WHO, 2015). As alterações moleculares decorrentes do envelhecimento no sistema cardiovascular tornam o envelhecimento em si um fator de risco para o desenvolvimento de DCV, mesmo após correção para fatores de risco cardiovasculares clássicos, como: fumo, sedentarismo, hipertensão arterial, dentre outros (Lakatta e Levy, 2003; Erusalimsky, 2009; Erusalimsky and Skene, 2009). Assim, com o envelhecimento da população, haverá cada vez mais carga nos sistemas de saúde o que implica mudanças profundas em políticas públicas de saúde. Para isso, será necessário melhorar nosso conhecimento sobre as alterações que ocorrem nos sistemas biológicos durante o envelhecimento.

## **1.2. Sistema vascular**

*“O homem é tão antigo quanto suas artérias”*

(Sir William Osler, 1891)

O sistema cardiovascular gera fluxo adequado para o organismo, regulando, assim, o transporte e distribuição de substâncias essenciais para os tecidos, remoção dos metabólitos, temperatura e pH (Michelini e Rossoni, 2008). Esse sistema é constituído pelo coração, que gera fluxo, por vasos arteriais e venosos, responsáveis pela distribuição e coleta, respectivamente, e pelos capilares, que permitem as trocas de substâncias entre o sangue e os tecidos. O médico inglês William Harvey provou em seus experimentos que o sistema circulatório do ser humano é composto por dois circuitos que foram denominados de circulação pulmonar e a circulação sistêmica (Harvey, 1628). Além da rede vascular, o sistema circulatório inclui também os vasos linfáticos.



**Figura 2** – Imagem representativa da estrutura e composição arterial (Adaptado de: Blausen.com staff (2014). "[Medical gallery of Blausen Medical 2014](#)")

Os vasos sanguíneos são compostos por 3 camadas (também chamadas de túnica) concêntricas: túnica adventícia (camada mais externa), média (camada intermediária) e íntima (camada mais interna) (**Figura 2**). A quantidade relativa de cada camada e a sua configuração modificam-se de acordo com a função do vaso sanguíneo.

A túnica adventícia é a camada mais externa do lúmen do vaso. É formada por tecido conjuntivo, fibroblastos orientados longitudinalmente, fibras colágenas e elásticas, tecido adiposo perivascular (PVAT) e outros tipos de células, como mastócitos e macrófagos. É através da túnica adventícia que penetra uma rede de vasos de pequeno calibre, chamados *vasa vasorum*, e fibras nervosas que inervam o músculo liso das artérias.

A túnica média é formada predominantemente por células musculares lisas (CMLs) e por fibras colágenas e elásticas. Essa camada, além de servir como suporte muscular da parede arterial, é responsável pela atividade vasomotora, de

modo que é a contração ou relaxamento das CMLs que afeta o diâmetro interno do vaso.

A túnica íntima do vaso está em contato direto com o sangue circulante e é formada pelo endotélio, uma monocamada de células epiteliais, lâmina basal e lâmina elástica interna.

O endotélio é uma monocamada de células endoteliais que funciona como uma barreira física entre o sangue e o tecido subjacente do vaso sanguíneo e atua também como um órgão endócrino capaz de produzir e liberar diferentes substâncias metabolicamente ativas que podem interferir com crescimento, migração e morte das CMLs, tônus vascular e fluidez sanguínea de acordo com alterações hemodinâmicas e estímulos hormonais (Colaço *et al.*, 2016).

Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram pela primeira vez o importante papel das células endoteliais durante o relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta isolada de coelho. Eles também demonstraram que esse relaxamento era produzido pela ativação de receptores muscarínicos nas células endoteliais e essa ativação liberava uma poderosa substância vasodilatadora que se difundia para as CMLs vasculares. Essa substância foi denominada "fator relaxante derivado do endotélio - EDRF".

Nessa altura já se sabia sobre a produção da prostaciclina ( $PGI_2$ ) pelas células endoteliais (Moncada e Vane, 1979) e, com a proposta do papel essencial das células endoteliais no controle vasomotor local, laboratórios de pesquisa confirmaram a existência de respostas dependentes do endotélio e iniciaram a busca pela identidade do misterioso EDRF e o mecanismo envolvido no controle do tônus vascular (Vanhoutte, 2009).

Rapoport e colaboradores (1983) observaram que alguns vasodilatadores dependentes do endotélio induziam relaxamento da musculatura lisa através da formação de GMP cíclico (GMPc) e consequente desfosforilação da cadeia leve de miosina de forma semelhante aos nitrovasodilatadores, como por exemplo o nitroprussiato de sódio (NPS).

Apenas em 1986, durante uma sessão do simpósio "Mecanismos de Vasodilatação", realizada em Rochester, Furchgott e Ignarro sugeriram, simultaneamente, que o EDRF seria o óxido nítrico (NO) (Ignarro *et al.*, 1987; Furchgott & Vanhoutte, 1989). Posteriormente, uma série de experimentos deu

respaldo a esta proposta e Palmer e colaboradores (1987) identificaram que o EDRF era o NO. Essa descoberta deu a Furchgott, Murad e Ignarro o prêmio Nobel de Medicina em 1998.

Sabendo que, além da PGI<sub>2</sub> e do NO, as células endoteliais poderiam gerar outros sinais que levariam a produção de diferentes EDRFs (De Mey *et al.*, 1982) e que esses sinais levavam à hiperpolarização do músculo liso vascular, os pesquisadores sugeriram a existência de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs). A PGI<sub>2</sub> (Corriu *et al.*, 1996a; Corriu *et al.*, 1996b) e o NO (Bolotina *et al.*, 1994) também podem levar a uma hiperpolarização do músculo liso abrindo diretamente canais de potássio nas CML.

Os EDHFs representam um conjunto de fatores tais como: metabólitos do ácido araquidônico, derivados da enzima do citocromo P450, endocanabinoides, peróxido de hidrogênio, sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), peptídeo natriurético tipo C, entre outras substâncias. A resposta mediada por esse fator pode ser induzida por diferentes agonistas, como bradicinina, acetilcolina, histamina ou substância P (Garland *et al.*, 1996). Mas, também, pode ser mediada pela ativação de mecanosensores no vaso, como ocorre em alterações na pressão arterial e/ou na tensão de cisalhamento (Davies, 1995; Félétou e Vanhoutte, 2006). É importante frisar que os EDHFs são muito importantes para o vasorelaxamento em vasos de resistência (Feletou e Vanhoutte, 2006) e também podem compensar a ausência do NO endotelial (Ding *et al.*, 2000; Brandes *et al.*, 2000; Huang, *et al.*, 2001).

Após a descoberta dos EDHFs, logo se tornou óbvio que, em veias e artérias (sob certas circunstâncias), as células endoteliais poderiam também gerar fatores contráteis derivados do endotélio (EDCF), tais como, angiotensina-II, endotelina-1, prostanóides vasoconstritores, como tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) e prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), e as espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido.

Através do equilíbrio entre a liberação de substâncias vasodilatadoras (EDRFs) e vasoconstritoras (ECRFs) fica clara a função primordial do endotélio na regulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo. Qualquer alteração neste equilíbrio pode resultar em uma disfunção endotelial, um preditor de doença cardiovascular.

O NO é um gás instável, com uma vida média muito curta e de fácil difusão

através das membranas biológicas (Welch e Loscazo, 1994). A variedade de reações químicas nas quais o NO pode participar é responsável pela multiplicidade de ações que ele exerce no sistema vascular, tais como, vasodilatação e prevenção da proliferação e migração de CMLs, adesão de leucócitos e agregação plaquetária.

A partir da descoberta do NO como um EDRF, o grupo de Salvador Moncada, inspirado pelo trabalho de John Hibbs em macrófagos (Hibbs *et al.*, 1987), provaram que as células endoteliais eram capazes de transformar o aminoácido L-arginina em NO e citrulina, isolaram a fração enzimática responsável e forneceram inibidores para essa enzima, como o L-N<sup>G</sup>-monomethyl Arginine citrate (L-NMMA) (Palmer *et al.*, 1988).

A disponibilidade de inibidores da NO sintase (NOS) permitiu a exploração do papel fisiológico do NO em tecidos e órgãos isolados e no organismo intacto. Inibidores da NOS aumentaram a pressão arterial *in vivo*, (Rees *et al.*, 1989) implicando o papel do mediador do endotélio na homeostase cardiovascular. No entanto, rapidamente ficou claro que a função do NO no organismo não está somente relacionada com o endotélio e que, na verdade, alterações na produção e disponibilidade do NO podem afetar quase todas as funções corporais (Andrew e Mayer, 1999; Balligand *et al.*, 2009).

Então, Bredt e Snyder (1990) isolaram a NOS do cérebro e foi descoberto que haviam 3 isoformas da enzima (Bredt *et al.*, 1991) classificadas na ordem de sua clonagem: NOS neuronal (nNOS, NOS 1), NOS induzível (iNOS, NOS 2) e, finalmente, NOS endotelial (eNOS, NOS 3). A síntese de NO se dá pela ação da NOS, que utiliza L-arginina e oxigênio molecular como substratos. A eNOS é a isoforma predominante no endotélio e é responsável pela maioria do NO produzido neste tecido (Föstermann *et al.*, 1994).

A elevação da concentração de cálcio citosólico e a ativação pelo complexo cálcio-calmodulina (Ca<sup>2+</sup>-CAM) é o principal mecanismo de ativação das isoformas constitutivas da NOS. O complexo Ca<sup>2+</sup>-CAM se liga ao seu sítio específico e facilita a transferência de elétrons do NADPH, via as flavinas FAD e FMN, no domínio redutase para o heme no domínio oxigenase. O domínio oxigenase liga o cofator essencial tetrahydropterina (BH<sub>4</sub>), oxigênio molecular e substrato L-arginina. No heme, os elétrons são usados para reduzir o oxigênio para oxidar a L-arginina formando L-citrulina e NO (Crane *et al.*, 1998; Alderton *et al.*, 2001). Contudo, a atividade da

enzima pode ser regulada também pela fosforilação em resíduos de serina (Ser), treonina (Thr) e tirosina (Tyr). Diferentes quinases, em estudos *in vitro*, foram capazes de fosforilar o resíduo Ser<sup>1177</sup> da eNOS e ativá-la, como: Akt1 (Fulton *et al.*, 1999; Gallis *et al.*, 1999), proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosine (AMPK) (Chen *et al.*, 1999; Michell *et al.*, 2001).

O estrógeno e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) fosforilam a eNOS principalmente através da Ser/Thr quinase Akt; a insulina ativa tanto Akt quanto AMPK; a fosforilação induzida por bradicinina é mediada por proteína quinase II dependente de Ca<sup>2+</sup>-CAM (CaMKII); e o estresse de cisalhamento pode estimular a eNOS via fosfoinosítido 3-quinase (PI3K)-Akt (Dimmeler *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999).

O resíduo Thr<sup>495</sup> é um sítio regulador negativo e sua fosforilação está associada à redução da atividade enzimática. A quinase constitutivamente ativa que fosforila este sítio é muito provavelmente a proteína quinase C (PKC). A desfosforilação do sítio Thr<sup>495</sup> também é uma das maneiras de ativação da eNOS, que pode ser realizada por fosfatases, como a fosfatase 1 (PP1) (Föstermann e Sessa, 2012).

Após ser sintetizado nas células endoteliais, o NO têm uma meia-vida muito curta e se difunde para o músculo liso, onde reage rapidamente com o ferro (Fe<sup>2+</sup>) do grupo heme do sítio ativo da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), estimulando-a a produzir a guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG exerce várias ações no músculo liso vascular, levando à hiperpolarização e desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição da interação da cabeça da cadeia leve da miosina com a actina, resultando em relaxamento do músculo liso vascular (Rapoport e Murad, 1983; Castel e Vaudry, 2001).

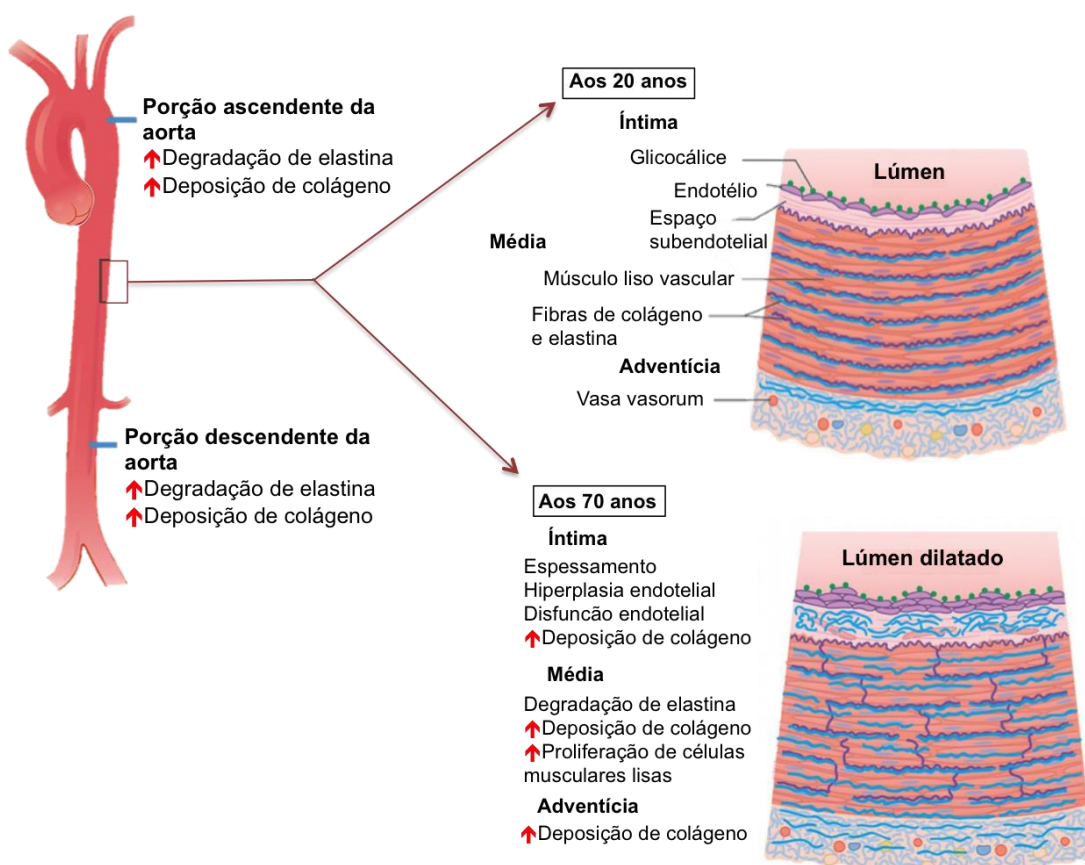
Alterações na conformação da eNOS, redução e/ou deficiência do co-fator essencial BH<sub>4</sub>, do substrato L-arginina ou na atividade das enzimas que ativam a eNOS podem levar a uma disfunção endotelial.

### **1.2.1. Envelhecimento vascular:**

Uma das estruturas onde as alterações do envelhecimento são bem evidenciadas são as artérias elásticas, como a aorta e seus principais ramos. No

esquema demonstrado na **Figura 3** podemos observar uma compilação das características observadas durante o envelhecimento nessas artérias (Whitlock e Hundley, 2015).

Essas artérias encontram-se próximas ao coração e recebem o sangue com uma maior pressão sanguínea do ventrículo esquerdo. Para se expandir e receber o volume de sangue ejetado durante a sístole essas artérias têm paredes muito distensíveis porque possuem grande quantidade de elastina na sua camada média podendo se expandir e retornar ao seu estado original durante a diástole, o que garante que o fluxo sanguíneo seja mantido sem grandes variações durante o relaxamento cardíaco (Nichols, 2011; Michelini e Rossoni, 2008).



**Figura 3 – Efeitos do envelhecimento arterial na composição e estrutura das camadas vasculares.** Na figura acima, a representação das principais características do envelhecimento na artéria aorta em comparação com um indivíduo jovem: na camada íntima do vaso podemos observar principalmente um espessamento desta camada, hiperplasia endotelial, disfunção endotelial e deposição de colágeno; a camada média apresenta a degradação de elastina, maior deposição de colágeno, maior proliferação de células musculares lisas; e na camada adventícia pode se observar uma maior deposição de colágeno (adaptado de: Whitlock e Hundley, 2015).



A espessura da parede vascular está relacionada à composição da parede vascular, ou seja, quantidade de músculo liso, fibras de elastina e colágeno; e a pressão sanguínea que o vaso terá que suportar. Devido às artérias elásticas serem as primeiras a receber o sangue ejetado do coração, com uma alta pressão sanguínea, elas são caracterizadas por terem uma parede com espessura tipicamente maior do que as pequenas artérias e veias (Westernhof *et al.*, 2008; Michelini e Rossoni, 2008).

Uma das características mais proeminentes do envelhecimento no sistema vascular é o espessamento da parede em grandes artérias elásticas, sendo que a espessura da camada íntima-média de artérias carótidas aumenta 2-3 vezes entre o 20º e o 90º ano de idade (Lakatta, 1993; Lakatta e Levy, 2003).

No envelhecimento, o aumento do espessamento íntima-média é acompanhado por dilatação do lúmen e aumento na rigidez, com redução na complacência e distensibilidade das artérias. Esse aumento, em uma determinada idade, prediz a coexistência de doença arterial coronariana silenciosa. O envelhecimento é o mais forte preditor da rigidez arterial (Vlachopoulos *et al.*, 2010).

Estudos *post-mortem* indicam que o espessamento da parede aórtica que ocorre com o envelhecimento consiste principalmente em espessamento da camada íntima, mesmo em populações com baixa incidência de aterosclerose (Virmani *et al.*, 1991), sendo caracterizada por aumento da deposição de colágeno e a presença de CMLs desorientadas (Lakatta *et al.*, 2009). Este remodelamento arterial em humanos saudáveis ocorre no contexto da disfunção endotelial associada à idade (Celermajer *et al.*, 1994), sendo que a disfunção endotelial é um dos principais mecanismos pelos quais o envelhecimento aumenta o risco de DCV (Rodríguez-Mañas *et al.*, 2009; Celermajer *et al.*, 1994; Taddei *et al.*, 1997; Gerhard *et al.*, 1996).

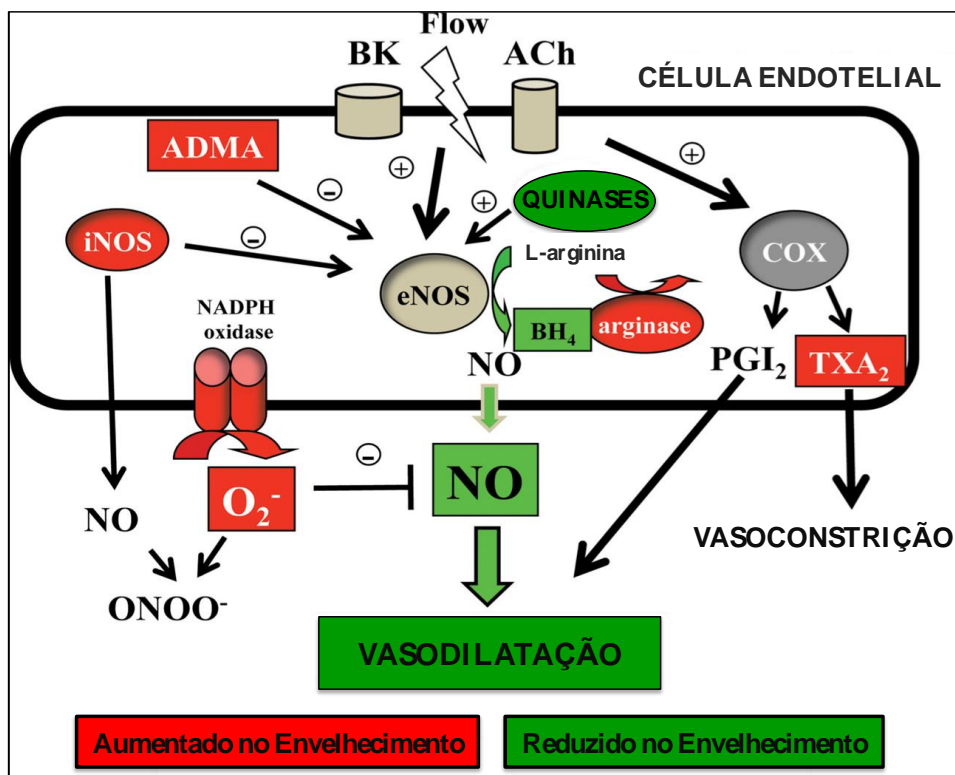
A disfunção endotelial é claramente multifatorial. No esquema demonstrado na **Figura 4** podemos observar alguns possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida pelo envelhecimento, que têm como consequência um desequilíbrio caracterizado pelo aumento na produção de EROs, fatores vasoconstritores derivados da cicloxigenase (COX) e uma redução da biodisponibilidade do principal vasodilatador produzido pelo endotélio, o NO (Ferrari *et al.*, 2003, Matz e Andriantsitohaina, 2003, Brandes *et al.*, 2005).

O desequilíbrio oxidativo está relacionado com o aumento da produção de EROs, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, e espécies reativas de nitrogênio, como peroxinitrito (Brandes *et al.*, 2005).

Uma das causas de redução da biodisponibilidade de NO é a reação entre o NO com ânion superóxido formando o radical peroxinitrito, que é citotóxico e não possui ação vasodilatadora. As principais fontes geradoras de ânion superóxido em vasos sanguíneos de animais e humanos velhos são as mitocôndrias (Zoltan *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2014), NADPH oxidase (Hamilton *et al.*, 2001; Lassègue *et al.*, 2012) e eNOS desacoplada (Delp *et al.*, 2008; Li e Förstermann, 2013).

Além da reação do NO com o ânion superóxido, a redução da atividade da eNOS também pode contribuir para a redução da disponibilidade de NO. A redução da atividade da eNOS pode ser devido à deficiência de L-arginina, aumento de inibidores endógenos da eNOS, deficiência dos cofatores da eNOS ou menor expressão dessa enzima (Matz e Andriantsitohaina, 2003).

Combinações desses processos ocorrendo em graus variados determinam o perfil geral de envelhecimento vascular de um determinado indivíduo.



**Figura 4 – Possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida pelo envelhecimento.** Em verde, reduzido no envelhecimento: produção de NO, L-arginina e substratos da eNOS, cofatores da eNOS (tetrahydrobiopterina – BH<sub>4</sub>), expressão e/ou atividade da eNOS, quinases que fosforilam a eNOS (ex. Akt, AMPK, PKA) e, consequentemente, a vasodilatação. Em vermelho, aumentado no envelhecimento: inibição do sítio ativo da eNOS por análogos da L-arginina (dimetilarginina simétrica – ADMA), atividade da iNOS, degradação da L-arginina por arginases, produção de tromboxano (TXA<sub>2</sub>), produção de radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Adaptado de El Assar *et al.*, 2012.

Apesar dos tratamentos efetivos para vários fatores de risco cardiovasculares estabelecidos, como hipertensão arterial e hipercolesterolemia, a incidência de doenças cardiovasculares deverá aumentar à medida que a população envelhece (Barodka *et al.*, 2011). Assim, torna-se crucial compreender os mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento e principalmente os mecanismos envolvidos no envelhecimento vascular para entender a biologia por trás das doenças cardiovasculares e buscar novos alvos terapêuticos.

### 1.3. Tecido adiposo perivascular (PVAT)

O PVAT é um tecido adiposo diferenciado que circunda a maioria dos vasos sanguíneos, com exceção dos vasos sanguíneos cerebrais e da microcirculação, e está em contato direto com a camada mais externa do vaso (adventícia) sem

nenhuma estrutura laminar ou barreira que os separem (Gao *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008), podendo influenciar a homeostase vascular secretando mediadores e hormônios de forma parácrina. O PVAT é constituído por adipócitos, pré-adipócitos, *vasa vasorum*, células do sistema imunológico (ex: macrófagos, mastócitos e linfócitos T), fibroblastos, células-tronco e inervação (Szasz e Webb, 2012). Porém, de acordo com a localização do leito vascular em que o PVAT se encontra esses tipos celulares e as suas quantidades podem variar (Gao, 2007).

O PVAT possui origem celular diferente dos demais tipos de tecido adiposo. Como foi observado por Chang e colaboradores (2012), a deleção condicionada do PPAR $\gamma$  em células que expressam SM22 $\alpha$ 1 impedem o desenvolvimento de PVAT em camundongos, sem interferir no desenvolvimento dos outros depósitos, como: interscapular, gonadal, inguinal, subcutâneo e periepididimal. O trabalho indica que o SM22 $\alpha$ , gene expresso em precursor de CMLs vasculares, deve ser expresso transitoriamente em células precursoras de PVAT ou que PVAT e as CML vasculares compartilham um precursor comum.

Ainda não há na literatura uma classificação definitiva do PVAT. Mas podemos classificar os tipos celulares encontrados no PVAT de acordo com a sua semelhança com os tipos celulares encontrados no tecido adiposo branco, marrom e bege. O PVAT do segmento torácico da aorta é composto por adipócitos semelhantes aos marrons, por serem multiloculares, possuírem grande número de mitocôndrias e maior expressão da proteína desacopladora 1 – UCP-1 (Cinti, 2011; Fitzgibbons *et al.*, 2011). Já o PVAT localizado no segmento abdominal da aorta e em artérias mesentéricas, por exemplo, é composto por adipócitos semelhantes aos brancos, sendo grandes e uniloculares e com uma menor área de vascularização e inervação (Brown *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2013).

Outro tipo de adipócito é o denominado bege, que possuem características morfológicas de adipócitos brancos, como uma vesícula de armazenamento de lipídeos, e de adipócitos marrons, como a expressão da proteína UCP-1 (Waldén *et al.*, 2012). Ainda não está bem esclarecido na literatura se esses adipócitos estão presentes no tecido por meio da diferenciação e maturação de células precursoras, sendo sua origem embrionária diferente dos demais adipócitos, ou se originam a partir de transdiferenciação dos adipócitos brancos, processo chamado de “browning” (Bolus e Hasty, 2018). No PVAT, estudos demonstraram a presença de

adipócitos beges somente a partir do processo de “browning” (Köng *et al.*, 2018), porém maiores esclarecimentos ainda são necessários (Hildebrand *et al.*, 2018).

O PVAT pode ser considerado um órgão endócrino que libera ácidos graxos livres por lipólise e várias proteínas bioativas, chamadas adipocinas, incluindo adiponectina, leptina e citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Aghamohammadzadeh e Heagerty, 2012). Assim como os tipos celulares do PVAT podem variar de acordo com o leito vascular, as substâncias liberadas pelo PVAT também podem variar de acordo com a sua localização (Galvez-Prieto *et al.*, 2008).

Em 1991, Soltis e Cassis foram os primeiros a sugerirem que o PVAT seria um regulador do tônus vascular, quando demonstraram que a presença do PVAT reduzia a vasoconstrição induzida por noradrenalina em aorta torácica de ratos. Esse efeito mediado pelo PVAT foi inibido pela desipramina, indicando a presença de mecanismos de captação e remoção de catecolaminas no PVAT (Soltis e Cassis, 1991).

Uma década depois, outro estudo importante foi realizado em ratos Sprague-Dawley por Löhn e colaboradores (2002). Eles demonstraram que o PVAT atenua acentuadamente a resposta contrátil à angiotensina II, fenilefrina e serotonina, vasoconstritores que não estão sujeitos aos mecanismos de recaptção de catecolaminas, em preparações de anéis de aorta torácica. Assim, o efeito anti-contrátil do PVAT não estaria somente relacionado à recaptção de catecolaminas, como demonstrado por Soltis e Cassis, mas também à liberação de fatores que induzem relaxamento do músculo liso (Löhn *et al.*, 2002).

O mesmo grupo propôs que o PVAT liberava um fator, que chamaram de ADRF (fator relaxante derivado do adipócito). A liberação do ADRF era  $Ca^{2+}$  dependente, regulado por vias de sinalização intracelular envolvendo tirosina quinase e PKA, não dependente de terminações nervosas perivasculares e do endotélio. Além disso, o efeito anti-contrátil do PVAT sobre o tônus arterial mesentérico se daria pela abertura de canais para potássio voltagem dependentes (Kv), que promoveria hiperpolarização da membrana celular do músculo liso vascular (Verlohren *et al.*, 2004). Estes estudos foram os primeiros a sugerirem que o PVAT era mais do que uma estrutura de suporte para o vaso sanguíneo e tinha um importante papel na regulação do tônus vascular de vasos sanguíneos com pequeno

e grande calibre. Em seguida, diversos trabalhos mostraram que na presença do PVAT, artérias e veias de diferentes espécies, incluindo humanos, exibem menores contrações, para uma variedade de vasoconstritores, do que quando desprovidas de PVAT (Soltis e Cassis, 1991; Dubrovskaja *et al.*, 2004; Gollasch e Dubrovskaja, 2004; Greenstein *et al.*, 2009), de modo que a presença desse tecido adiposo se mostra relacionada com efeitos vasculares benéficos em indivíduos saudáveis. Contudo, os mecanismos pelos quais o PVAT promove este efeito anticontrátil podem variar de acordo com o agonista, leito vascular e espécie de animais estudados (Löhn *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2007; Weston *et al.*, 2013; Margaritis *et al.*, 2013).

Atualmente, sabemos que o PVAT pode liberar vários fatores vasodilatadores, como ADRF (Löhn *et al.*, 2002; Dubrovskaja *et al.*, 2004; Verlohren *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2006), leptina (Payne *et al.*, 2010; Dashwood *et al.*, 2011), adiponectina (Meijer *et al.*, 2013; Weston *et al.*, 2013), angiotensina 1-7 (Lee *et al.*, 2009), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gao *et al.*, 2007), H<sub>2</sub>S (Schleifenbaum *et al.*, 2010), prostaglandinas (Ozen *et al.*, 2013), palmitato (Lee *et al.*, 2011) e NO (Gil-Ortega *et al.*, 2010). Além disso, sob estímulo elétrico, o PVAT também libera fatores vasoconstritores, como a angiotensina II (Lu *et al.*, 2010) e o ânion superóxido (Gao *et al.*, 2006).

O PVAT expressa os componentes do sistema renina-angiotensina (Gálvez-Prieto *et al.*, 2008) e uma maquinaria complexa de produção e remoção de EROs e RNS (Gao *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2016), contendo, entre outras, NADPH oxidase (Marchesi *et al.*, 2009), eNOS (Dashwood *et al.*, 2007; Xia *et al.*, 2016), Cu/Zn-superóxido dismutase (SOD) e Mn-SOD (Victorio *et al.*, 2016; Baltieri *et al.*, 2018). A produção de hormônios esteroides estradiol, cortisol e aldosterona (Briones *et al.*, 2012; Victorio *et al.*, 2016) pelo PVAT também é possível, embora ainda não totalmente comprovada (Szasz e Webb, 2012; Assersen *et al.*, 2018).

Há evidências que a interação entre o PVAT e a parede vascular é bidirecional, permitindo que o PVAT atue como um sensor do estresse oxidativo e inflamação vascular e, em resposta, há uma alteração em seu comportamento secretor e conseqüentemente seus efeitos parácrinos na parede vascular (Margaritis *et al.*, 2013).

Uma razão significativa para investigar o PVAT é a perda do efeito anticontrátil do PVAT em DCV e fatores de risco. Gao e colaboradores (2005)

demonstraram que o efeito anticontrátil do PVAT parece estar perdido em um modelo animal de obesidade, apesar de maiores quantidades de PVAT. Da mesma forma, o nosso grupo demonstrou que a obesidade, induzida por dieta hiperlipídica, inibe a ação anticontrátil do PVAT em artérias mesentéricas (Hashimoto, 2016). Esses achados sugerem que o PVAT pode desempenhar um papel na patologia das DCV.

Fang e colaboradores (2009) mostraram que em ratos normotensos velhos, a produção endógena de H<sub>2</sub>S em aorta e PVAT estava diminuída. Kong e colaboradores (2018) demonstraram que o envelhecimento induz uma redução do “browning” no PVAT de aorta torácica de ratos hipertensos SHRs e sugeriram que a adenosina pode ser um potencial ADRF, que está reduzida no PVAT de aorta torácica de animais velhos. Portanto, a ação anticontrátil do PVAT parece ser prejudicada no envelhecimento, que é um fator de risco para DCV, de modo que o PVAT é um potencial alvo terapêutico.

Apesar de alterações vasculares já terem sido caracterizadas durante o envelhecimento, aspectos do PVAT no envelhecimento ainda são pouco conhecidos e permanece a questão de quando, temporalmente, as mudanças no PVAT ocorrem em relação à disfunção endotelial. Por isso, há uma necessidade de se explorar a sua função e mecanismos envolvidos nesta condição, que poderiam apontar novos alvos terapêuticos para prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares em indivíduos idosos (Akoumianakis *et al.*, 2016).

#### **1.4. SAMP-8 - Modelo murino de envelhecimento**

O maior desafio em estudar as alterações e mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento é a longa duração dos estudos. Nesse sentido, o SAMP-8 (do inglês, *senescence-accelerated mouse prone - 8*) é considerado um modelo animal útil para o estudo do processo de envelhecimento (Takeda *et al.*, 1981).

A linhagem de camundongos SAMP é considerada um modelo de envelhecimento precoce e foi desenvolvida a partir do cruzamento entre irmãos da linhagem AKR/J, modelo murino para estudos de leucemia, que apresentavam características de exaustão severa. Dentro do mesmo grupo de AKR/J havia padrões diferentes de envelhecimento entre os animais e os autores estabeleceram um *score* de envelhecimento que pontuava as características como falta de brilho na

pelagem, rugosidade da pele, lesões oftalmológicas e tempo de vida (Hosokawa *et al.*, 1983).

A partir deste *score*, foi realizado o cruzamento entre machos e fêmeas que obtiveram *score* mais elevado e, após cinco cruzamentos, as características avaliadas se mantiveram e passaram a ser desenvolvidas mais precocemente, surgindo assim a linhagem SAMP. Dentre esses, havia os animais que, com a mesma faixa etária, não desenvolviam envelhecimento precoce – *score* baixo – e, por isso, foram denominados “resistentes à senescência acelerada” (SAMR).

Atualmente são descritas nove linhagens de SAMP (SAMP-1/2/3/6/7/8/9/10/11) e três de SAMR (SAMR-1/4/5). As linhagens foram caracterizadas de acordo com determinadas características em comum. Por exemplo, a linhagem SAMP-8, SAMP-6 e SAMP-10 foram amplamente utilizadas como modelo de déficit cognitivo, devido a alterações cerebrais semelhantes a da doença de Alzheimer; além de disfunção cardíaca e desregulação do sistema imunológico (Butterfield e Poon, 2005; Forman *et al.*, 2011).

Fêmeas da linhagem SAMP-8 apresentam alterações vasculares similares às observadas com o envelhecimento cronológico, pois apresentam aumento na vasoconstrição induzida por fenilefrina e U46619 (análogo do TXA<sub>2</sub>) e redução na vasodilatação induzida por acetilcolina, que aparecem apenas a partir dos 6 meses de idade (Novella *et al.*, 2010; Novella *et al.*, 2013). Machos de camundongos SAMP-8 também apresentam alterações da reatividade vascular aos 6-7 meses de idade (Lloréns *et al.*, 2007), porém a avaliação temporal das alterações vasculares no modelo SAMP-8 até agora só foram bem caracterizadas em fêmeas (Jiménez-Altayó *et al.*, 2013; Novella *et al.*, 2013; Onetti *et al.*, 2013; Dantas *et al.*, 2014).

Fêmeas de camundongos SAMP-8 apresentam menor déficit de memória do que machos na mesma idade (Flood *et al.*, 1995), sendo que os machos já apresentam discreta alteração aos dois meses de idade (Miyamoto *et al.*, 1986) e aos quatro meses de idade já apresentam marcado déficit de memória, aumento da ansiedade e depressão (Yanai e Endo, 2016). Os hormônios sexuais femininos conferem proteção no sistema vascular tanto em modelos experimentais de hipertensão arterial como em mulheres hipertensas (Dantas *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2008). Portanto, machos de camundongos SAMP-8 podem apresentar alterações vasculares em idade mais jovem do que fêmeas. Assim, com esse estudo



pretendemos caracterizar as alterações vasculares e a ação anticontrátil do PVAT em machos de camundongos SAMP-8 com 3 meses de idade, validando esse camundongo como modelo para os estudos que buscam entender os mecanismos e alvos terapêuticos para o envelhecimento vascular.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a reatividade vascular e a influência do PVAT da aorta torácica de camundongos SAMP-8 e seus controles SAMR-1 machos.

### **2.1.Delineamento experimental**

- Avaliar o relaxamento, dependente do endotélio e induzido por doador de NO, e a contração em aorta torácica, na ausência e presença de PVAT, de camundongos de 3 meses de idade.
- Avaliar a modulação da contração pelo endotélio e NO em aorta torácica, na ausência e presença de PVAT, de camundongos de 3 meses de idade.
- Avaliar a influência de EROs na contração em aorta torácica, na ausência e presença de PVAT, de camundongos SAMP-8 de 3 meses de idade.
- Avaliar o conteúdo da eNOS fosforilada em serina<sup>1177</sup> e enzimas antioxidantes e geração de ânion superóxido na aorta torácica e PVAT de camundongos SAMP-8 de 3 meses de idade.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os preceitos da lei brasileira nº 11.794 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) sob o número 73/2016 e 82/2017. As matrizes de camundongos SAMP-8 e SAMR-1 foram cedidas pela Dra. Ana Paula Dantas do *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer*, Universidade de Barcelona. As linhagens SAMP-8 e SAMR-1 foram mantidas com o cruzamento entre irmãos no Biotério do Departamento de Farmacologia (ICB/USP). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, que foram alojadas no Biotério do Departamento de Farmacologia, em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (12 horas/12 horas) com livre acesso à ração e água.

#### **3.2. Caracterização**

##### **3.2.1. Evolução ponderal e consumo de ração, calorias e água**

Um grupo de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 foram pesados semanalmente e o consumo semanal médio de ração, calorias e água foi determinado a partir dos 21 dias de vida (dia do desmame) até o dia da eutanásia aos 3 meses de idade, equivalente a 9 semanas de acompanhamento.

##### **3.2.2. Glicemia, comprimento naso-anal e obtenção do sangue e tecidos**

Os camundongos com 3 meses de idade foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) na sala de experimentação do biotério e transportados em uma caixa apropriada para o laboratório. A glicemia foi determinada por fitas reativas "OneTouch-Ultra" e glicosímetro "OneTouch-Lifescan" (Johnson & Johnson, EUA) em amostra de sangue obtida por punção caudal no animal em restrição total de alimentos por 4 horas.

Em seguida, o comprimento naso-anal dos camundongos foi aferido com auxílio de uma régua e as amostras de sangue foram coletadas por punção do ventrículo esquerdo e transferidas para tubos contendo EDTA (BD Biosciences).

Então, as cavidades torácica e abdominal foram abertas e foram removidos: aorta torácica, depósitos de gordura periepididimal, retroperitoneal, inguinal e interscapular, músculo gastrocnêmio, coração e tibia (esquerda). Aorta torácica foi colocada em uma placa contendo solução nutriente Krebs-Henseleit modificado (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).

### **3.2.3. Índice de Lee, conteúdo de gordura e massa magra**

O índice de Lee foi determinado utilizando-se a fórmula: [massa corporal<sup>1/3</sup> (g) /comprimento naso-anal (cm)] x 100. A massa das gorduras (periepididimal, retroperitoneal, inguinal e interscapular) e do músculo gastrocnêmio foram corrigidas pela massa corpórea aos 3 meses de idade. A massa do ventrículo esquerdo foi corrigida pelo comprimento da tibia.

### **3.2.4. Concentração plasmática de colesterol total e triglicérides**

A partir das amostras de sangue foi obtido o plasma dos animais por centrifugação (3.000 rpm por 15 minutos) e os lipídeos foram dosados por ensaios colorimétricos (kits Liquiform, Labtest, Brasil).

### **3.3. Reatividade vascular**

A aorta torácica foi removida como descrito anteriormente e a região descendente da aorta torácica foi seccionada em quatro anéis transversais de 2,0 mm de comprimento que foram separados da seguinte maneira:

- o endotélio e o PVAT foram mantidos íntegros – PVAT(+);
- o endotélio foi mantido íntegro e o PVAT foi removido – PVAT(-);
- o endotélio foi removido mecanicamente com a fricção do lúmen com uma haste metálica e o PVAT foi mantido íntegro – PVAT(+)/E(-);
- o endotélio e o PVAT foram removidos – PVAT(-)/E(-).

Os anéis foram, então, transferidos para cubas de miógrafo de força (MultWire Myograph System 620M, DMT, Dinamarca), preenchidas com solução de Krebs-Henseleit gaseificada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, e fixados com dois ganchos de aço inoxidável, inseridos no lúmen dos anéis, para medida de tensão isométrica. O miógrafo foi conectado a um sistema de aquisição de dados

(PowerLab, ADInstruments, Austrália) e a um computador para registro das respostas vasculares.

Após a montagem dos anéis nas cubas, as preparações foram mantidas sob tensão basal de 1,0 g por 45 minutos a 37°C para estabilização, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 15 minutos. Esta tensão basal foi a tensão que resultou na força contrátil máxima padronizada em experimentos anteriores no laboratório (Soares *et al.*, 2017). Após o período de estabilização, solução de cloreto de potássio (KCl, 96 mM) foi adicionada à cuba e mantida durante 15 minutos, com a finalidade de avaliar a integridade do músculo liso. A presença ou não do endotélio foi avaliada pelo relaxamento induzido pela acetilcolina ( $10^{-5}$  M) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina ( $10^{-7}$  M, concentração que produz 50% da resposta máxima).

A contração ao KCl foi semelhante entre os anéis tanto da linhagem SAMR-1 (PVAT-:  $0,79 \pm 0,05$  g; PVAT+:  $0,78 \pm 0,06$  g; PVAT-/E-:  $0,78 \pm 0,10$  g; PVAT+:  $0,78 \pm 0,16$  g) quanto da linhagem SAMP-8 (PVAT-:  $0,88 \pm 0,03$  g; PVAT+:  $0,94 \pm 0,04$  g; PVAT-/E-:  $0,77 \pm 0,11$  g; PVAT+:  $0,81 \pm 0,13$  g). O endotélio foi considerado íntegro quando o relaxamento induzido pela acetilcolina foi superior a 70% para os camundongos SAMR-1 e a 60% para os SAMP-8. Anéis em que o endotélio foi removido foram incluídos no estudo se o relaxamento fosse inferior a 10% nas duas linhagens.

Após o procedimento de padronização e nova estabilização de 30 minutos, foram realizadas as curvas concentração-resposta para o vasoconstritor noradrenalina (agonista adrenérgico não-seletivo) e, após lavagem com solução de Krebs-Henseleit e um novo período de estabilização foram realizadas as curvas concentração-resposta para os vasodilatadores acetilcolina (agonista muscarínico, vasodilatador dependente do endotélio) e nitroprussiato de sódio (NPS, doador de NO) em anéis pré-contraídos com fenilefrina. Durante a realização dos experimentos, a ordem de realização das curvas foi alternada.

Em uma série de experimentos, as curvas concentração-resposta para noradrenalina foram realizadas na presença do inibidor da NOS L-NAME ( $10^{-4}$  M) ou inibidor não seletivo da COX indometacina ( $10^{-5}$  M) ou a enzima que decompõe o  $H_2O_2$  catalase (100 U/ml) ou SOD (150 U/ml), adicionados 30 minutos antes do início da curva.

Ao final do experimento, a contração induzida por KCl (96 mM) durante 60 min foi avaliada em anéis E(+) com a finalidade de avaliar se a presença do PVAT compromete mecanicamente a capacidade de contração do músculo liso. A resposta de relaxamento foi expressa como porcentagem de relaxamento da contração induzida pela fenilefrina e a resposta de contração foi expressa como aumento da tensão a partir da tensão basal (g).

### **3.4. Western blotting**

#### **3.4.1. Coleta dos tecidos**

Para realização dos experimentos de *Western blotting* e determinação do conteúdo de ânion superóxido, o segmento torácico da aorta, com o PVAT mantido íntegro (PVAT+), foi dividido em duas partes e transferidos para tubos contendo 1 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a 37°C e gaseificada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os tubos foram mantidos em estufa a 37°C por 10 minutos. Em seguida, os segmentos de aortas PVAT+ foram transferidos para um novo tubo contendo 1 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida e gaseificada contendo noradrenalina (10<sup>-5</sup> M) ou tubo contendo apenas 1 ml de solução de Krebs-Henseleit (basal). Em experimento prévio, onde se avaliou o tempo de incubação (5, 10, 20 e 30 minutos) com noradrenalina, o tempo de 10 minutos foi escolhido porque foi o tempo em que houve aumento da fosforilação da eNOS em comparação ao basal sem promover saturação. Após 10 minutos de incubação, as aortas PVAT+ foram retiradas dos tubos e colocadas em solução de Krebs-Henseleit gelada contendo ortovanadato de sódio (10<sup>-1</sup> M), fluoreto de sódio (10<sup>-1</sup> M) e pirofosfato de sódio (10<sup>-1</sup>), para inibição de fosfatases. O PVAT foi separado da aorta e ambos foram banhados em solução de Krebs-Henseleit gelada, secados em papel filtro e congelados em nitrogênio líquido e mantidos em -80°C.

#### **3.4.2. Western blotting**

Os tecidos mantidos a -80°C foram pulverizados em almofariz de porcelana com auxílio de um pistilo, homogeneizados e incubados por 30 minutos com tampão de lise RIPA (Thermo Scientific) a 4°C. Os extratos do PVAT foram, primeiramente, centrifugados a 3.500 g, a 4°C, por 5 minutos para separação da gordura e, posteriormente, os extratos teciduais do PVAT e da aorta, foram centrifugados a

10.000 g, a 4°C, por 30 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e utilizado para a quantificação do conteúdo proteico total, utilizando-se o método BCA (ácido bicincônínico, Thermo Scientific). Após a quantificação de proteínas, as amostras foram tratadas e armazenadas com tampão de Laemmli contendo DTT (ditiotreitól, 200 mM).

Posteriormente, 30 µg de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS PAGE, 10%) e submetidos à eletroforese em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, EUA) a 100 V. Em cada gel foi aplicado também um marcador de peso molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita *overnight* eletricamente para uma membrana de PVDF ou Nitrocelulose, utilizando-se aparelho da BioRad a 230 mA.

As membranas foram, então, incubadas com solução bloqueadora, constituída por TBS-T (Tris, 10 mM, pH 7,4; NaCl, 150 mM; Tween 20, 0,02%) e albumina bovina (3% ou 5%), em temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos na membrana. Posteriormente, as membranas foram incubadas individualmente com os anticorpos primários (**Tabela 1**) diluídos em solução bloqueadora, por aproximadamente 14 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com solução TBS-T em temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos secundários IgG conjugados com peroxidase, diluídos em solução bloqueadora. O procedimento de lavagem foi repetido e, então, as membranas foram reveladas com solução quimioluminescente como descrito pelo fabricante do kit (Clarity Max™ Western ECL Substrate, Biorad). A quimioluminescência foi detectada em um fotodocumentador (Chemidoc) e a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização do programa ImageJ (NIH, EUA). A densidade óptica foi normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau da respectiva amostra (Romero-Calvo *et al.*, 2010) e os valores expressos em unidade arbitrária (UA).

**Tabela 1 – Anticorpos utilizados para *Western blot***

<b>Anticorpos Primários</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>	<b>Nº Catálogo</b>
<b>Phospho-eNOS (Ser1177)</b>	1:1000	Cell Signalling	#9571
<b>eNOS</b>	1:1000	BD	#610297
<b>Mn-SOD</b>	1:1000	Upstate	#06-984
<b>Cu/Zn-SOD</b>	1:1000	Upstate	#07-403
<b>Catalase</b>	1:2000	Sigma	#C0979

### **3.5. Determinação do conteúdo tecidual de ânion superóxido pelo método de quimioluminescência da lucigenina**

A geração de ânion superóxido na aorta e no PVAT foi avaliada por ensaio de quimioluminescência, utilizando a lucigenina como acceptor de elétrons e NAD(P)H como substrato, como descrito anteriormente (da Costa *et al.*, 2018). O procedimento foi realizado em aorta e PVAT, basal ou estimulado como descrito no item 3.4.1. Os tecidos foram colocados em tubos individuais no tampão de trabalho (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM; EGTA, 1 mM; sacarose, 150 mM, pH 7,4). Os ensaios foram realizados em volume final de 100 µL, contendo amostra, lucigenina (5 µL), NAD(P)H (0,1 mM) e tampão. A luminescência foi medida por 30 ciclos de 18 segundos cada. A geração de ânion superóxido foi expressa em unidades relativas de luminescência normalizada pelo peso seco do tecido em relação ao sinal basal.

### **3.6. Análise estatística**

A resposta máxima e o log da EC50 (log da concentração que induz 50% da resposta máxima) foram obtidos a partir da análise de regressão não linear para cada curva concentração-resposta. Os resultados são mostrados como média ± erro padrão da média. A análise estatística foi realizada por teste *t-Student* ou análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguida de teste de múltiplas comparações Tukey. O nível de significância aceito foi  $P < 0,05$ . O n representa o número de animais avaliados.



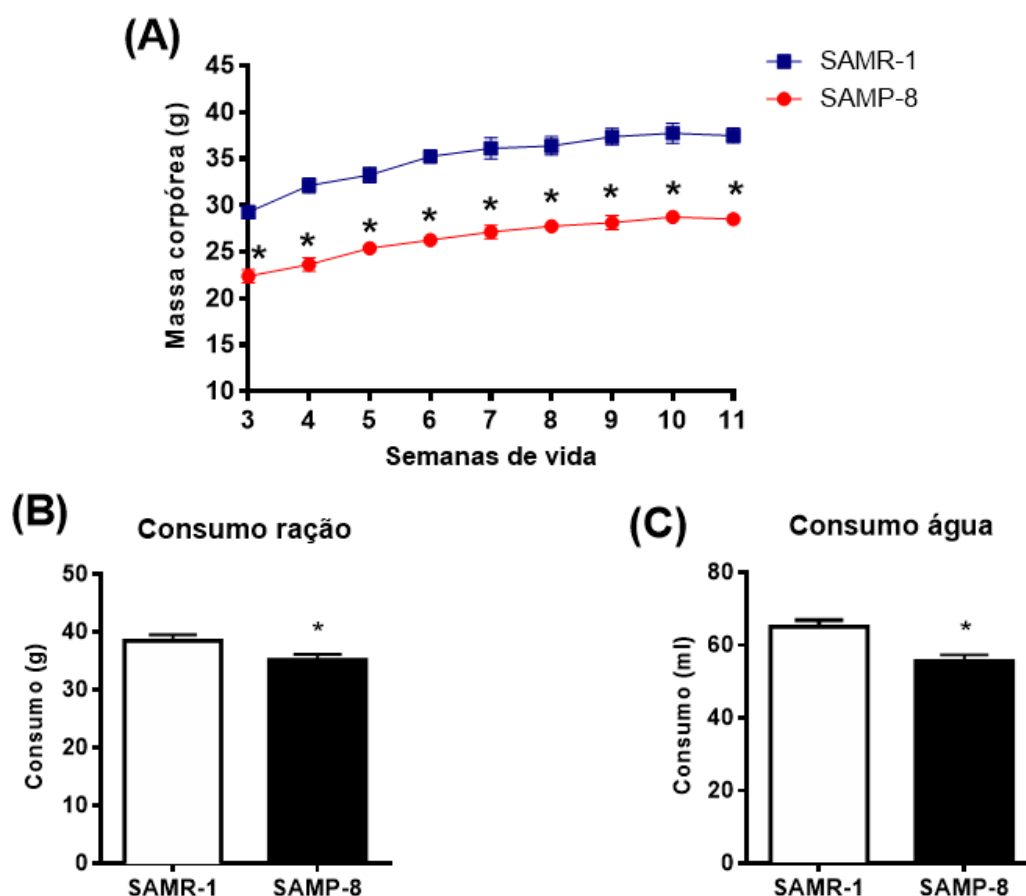
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização do modelo experimental

#### 4.1.1 Evolução ponderal, consumo de água e ração

Camundongos SAMP-8 apresentaram menor massa corpórea em comparação com os camundongos SAMR-1 da mesma idade (**Figura 5A**).

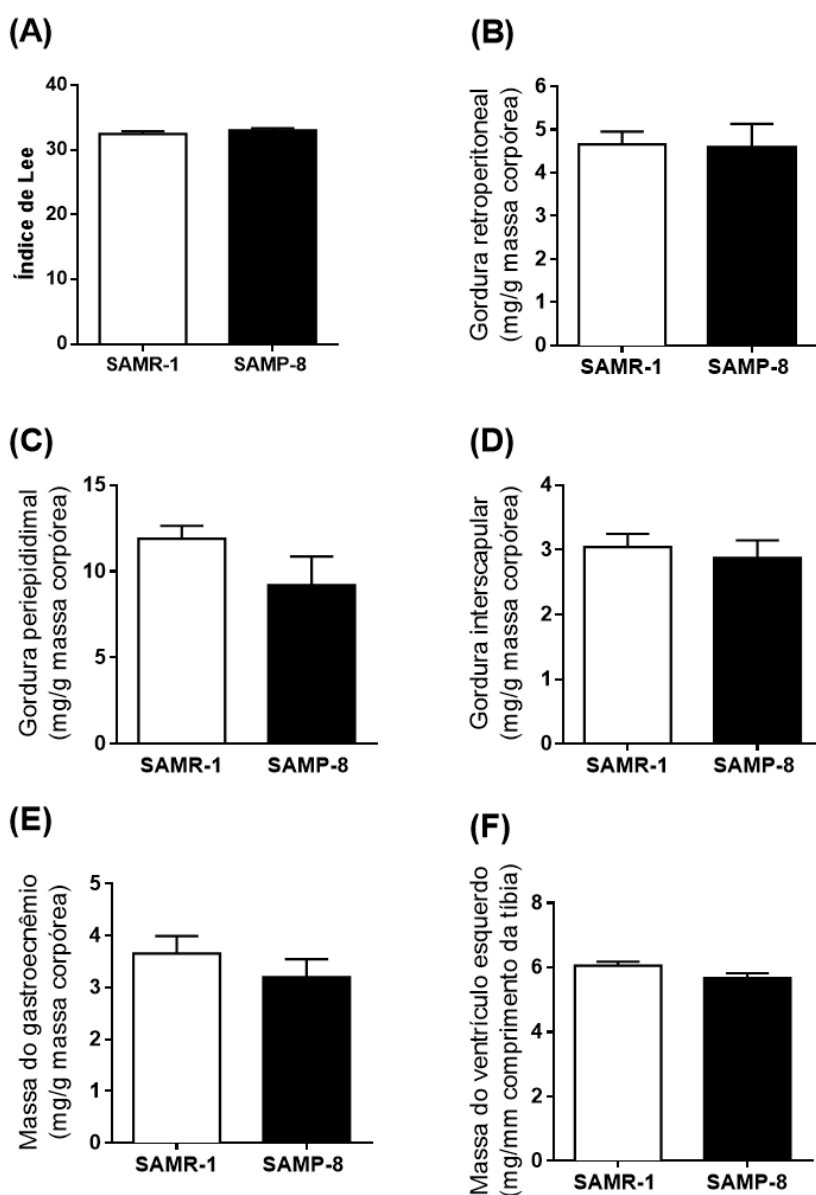
Os animais SAMP-8 já apresentaram menor peso em relação ao SAMR-1 no momento do desmame e essa diferença de peso se manteve até os 3 meses de idade. O consumo de ração e água pelos camundongos SAMP-8 foi reduzido em relação ao consumo de camundongos SAMR-1 (**Figura 5B e C**).



**Figura 5 - Massa corpórea ao longo de 9 semanas (A) e consumo médio por semana de ração (B) e água (C) de camundongos SAMR-1 e SAMP-8. No gráfico A: cada ponto representa média  $\pm$  EPM; \*  $P < 0,05$  (ANOVA duas vias);  $n = 10$  animais/grupo. Nos gráficos B e C: as barras representam média  $\pm$  EPM; \*  $P < 0,05$  (Teste  $t$ );  $n = 10$ .**

#### 4.1.2. Índice de Lee, massa dos depósitos de gordura, massa magra e do ventrículo esquerdo

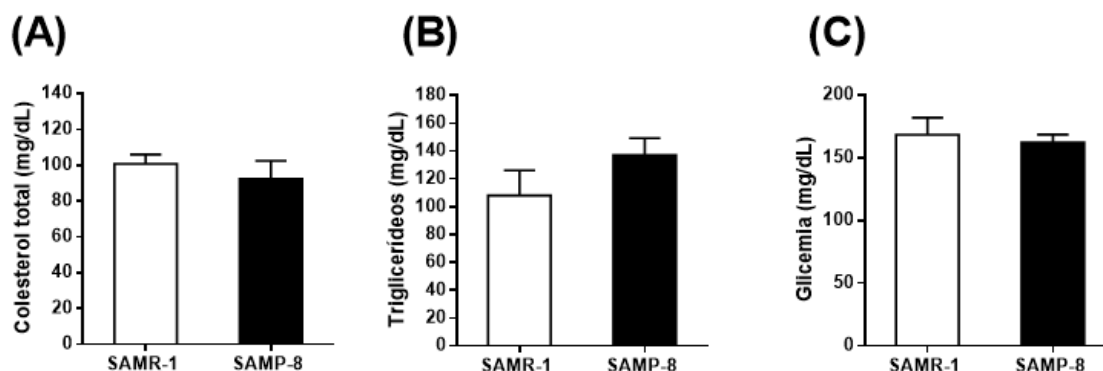
O índice de Lee (**Figura 6A**), massas dos depósitos de tecido adiposo branco retroperitoneal (**Figura 6B**) e periepídidimal (**Figura 6C**) e marrom interscapular (**Figura 6D**), massa do músculo gastrocnêmio (**Figura 6E**) e a massa do ventrículo esquerdo (**Figura 6F**) de camundongos SAMP-8 foram semelhantes aos dos camundongos SAMR-1.



**Figura 6** - Índice de Lee  $\{[\text{peso corporal}^{1/3}(\text{g})/\text{comprimento naso-anal (cm)}] \times 100\}$  (A), massa relativa dos depósitos de gorduras retroperitoneal (B), periepídidimal (C) e interscapular (D), massa do gastrocnêmio (E) e massa do ventrículo esquerdo (F) de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 aos 3 meses de idade. As barras representam média  $\pm$  EPM. Teste *t*.  $P > 0,05$ .  $N = 10$  animais/linhagem.

### 4.1.3. Parâmetros bioquímicos

A glicemia (**Figura 7A**) e a concentração plasmática de colesterol total e triglicerídeos (**Figura 7B**) foram semelhantes em camundongos SAMP-8 e SAMR-1.

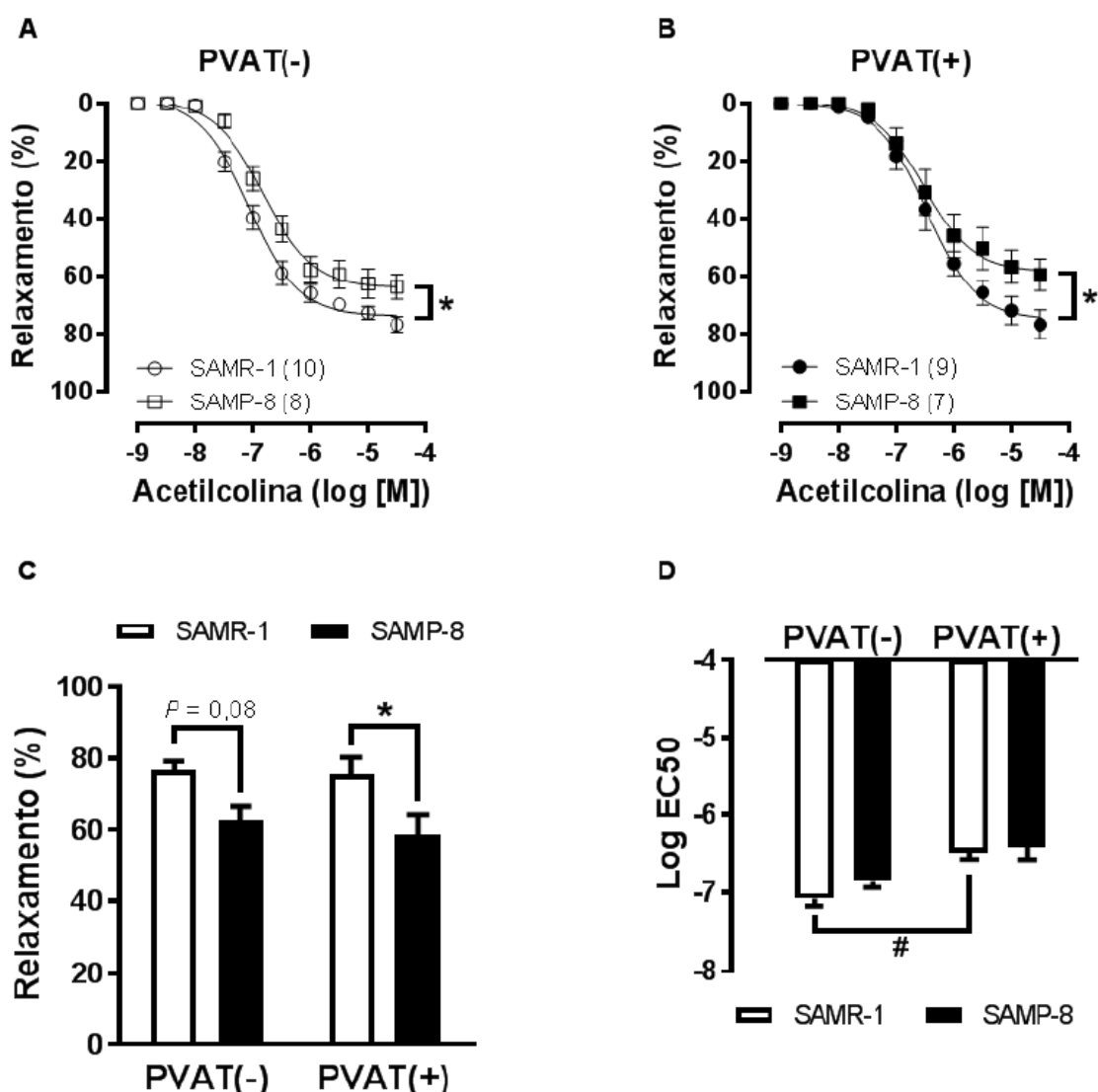


**Figura 7** - Glicemia e concentração plasmática de colesterol total e triglicerídeos. Colesterol total (A), triglicerídeos (B) e glicemia (C) de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 aos 3 meses de idade. As barras representam média  $\pm$  EPM. *Teste t*.  $P > 0,05$ .  $N = 10$  animais/linhagem.

### 4.2. Relaxamento dependente do endotélio e influência do PVAT em camundongos com 3 meses de idade

A acetilcolina promoveu relaxamento dependente de concentração nos anéis de aorta torácica de camundongos SAMP-8 e SAMR-1, tanto na ausência (PVAT-) quanto na presença (PVAT+) de PVAT (Figura 8A e 8B). A comparação entre as curvas mostrou que o relaxamento induzido pela acetilcolina foi menor em anéis PVAT(-) e PVAT(+) de camundongos SAMP-8 em relação às curvas dos respectivos anéis de SAMR-1 (Figura 8A e 8B).

Em relação aos parâmetros farmacológicos das curvas concentração-reposta para acetilcolina, a diferença de  $R_{max}$  dos anéis PVAT(-) de camundongos SAMP-8 em relação aos respectivos anéis de camundongos SAMR-1 não alcançou nível de significância ( $P = 0,08$ ), mas a diferença entre os anéis PVAT(+) de camundongos SAMP-8 e SAMR-1 foi significativa (Figura 8C). A  $R_{max}$  dos anéis PVAT(+) dos camundongos SAMR-1 e SAMP-8 foi semelhante à  $R_{max}$  dos anéis PVAT(-) dos respectivos camundongos (Figura 8C). O  $\log EC_{50}$  nos anéis PVAT(-) e PVAT(+) de camundongos SAMP-8 não foi diferente ao  $\log EC_{50}$  dos respectivos anéis de camundongos SAMR-1, mas foi reduzido em anéis PVAT(+) em relação aos anéis PVAT(-) das respectivas linhagens (**Figura 8D**).



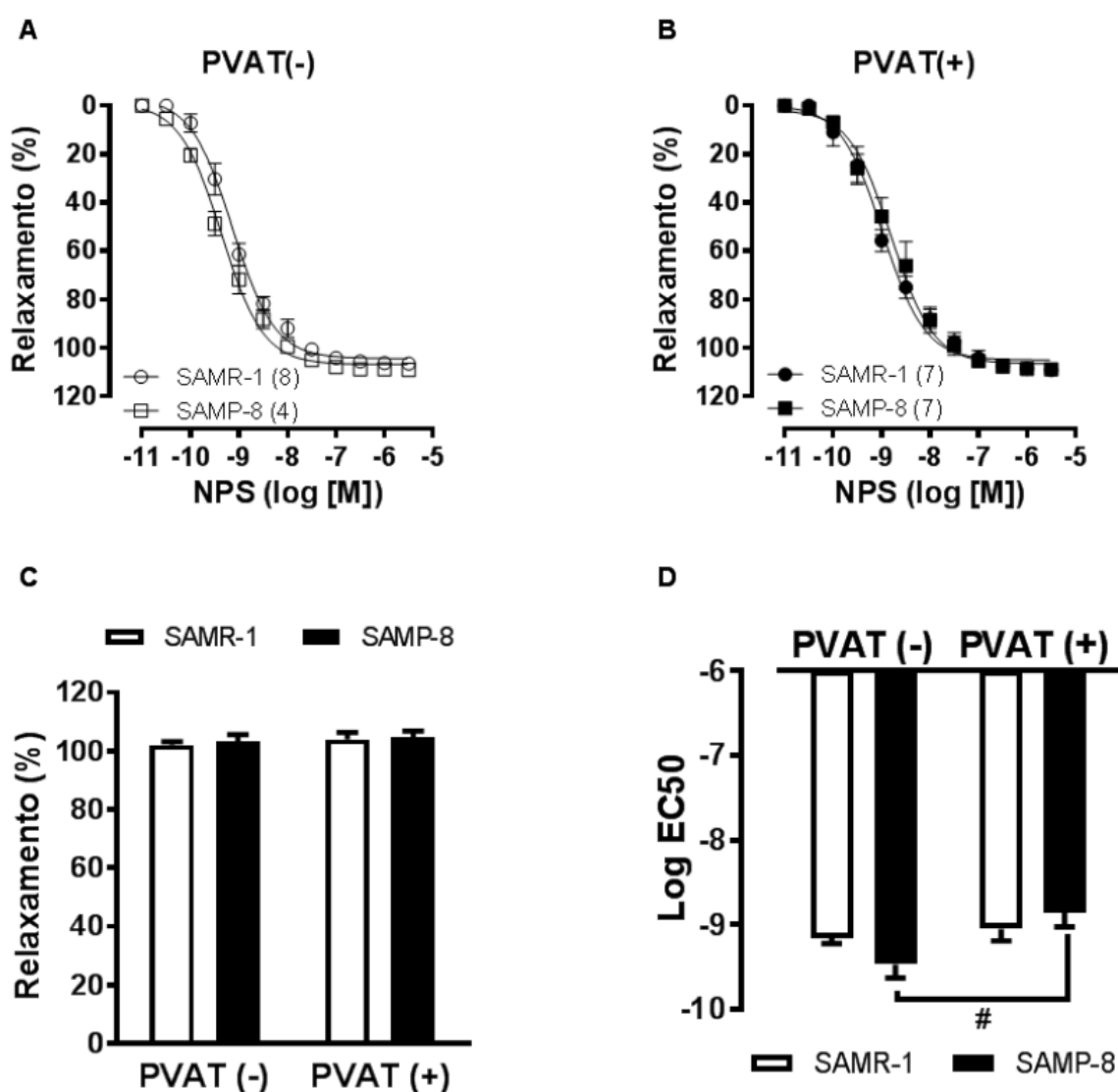
**Figura 8** - Curva concentração-resposta (A e B), resposta máxima (C) e sensibilidade (D, log EC50) para acetilcolina em anéis de aorta torácica, na presença do endotélio e com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivascular (PVAT) intacto, de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey: \*  $P < 0,05$ , SAMP-8 versus SAMR-1; #  $P < 0,05$ , PVAT(+) versus PVAT(-). Número de animais avaliados encontra-se entre parênteses.

### 4.3. Relaxamento ao doador de NO e influência do PVAT em camundongos com 3 meses de idade

O NPS promoveu relaxamento dependente de concentração nos anéis de aorta torácica sem endotélio de camundongos SAMP-8 e SAMR-1, tanto na ausência (PVAT-) quanto na presença (PVAT+) de PVAT (Figura 9A). A comparação entre as curvas para NPS mostrou que o relaxamento, tanto em anéis PVAT(-) quanto PVAT(+), foi semelhante entre as linhagens (Figura 9A). Não houve diferença entre os anéis PVAT(-) e PVAT(+)

relaxamento em anéis PVAT(+) foi reduzido em relação aos anéis PVAT(-) de camundongos SAMP-8 (Figura 9A e 9B).

A Rmax e o log EC50 das curvas para NPS dos anéis PVAT(-) e PVAT(+) de camundongos SAMP-8 foi semelhante aos respectivos anéis de SAMR-1 (Figura 9C e 9D). Esses parâmetros foram semelhantes entre os anéis PVAT(+) e PVAT(-) de camundongos SAMR-1. Contudo, a sensibilidade (log EC50) foi reduzida em anéis PVAT(+) em relação aos anéis PVAT(-) de camundongos SAMP-8, sem diferença para a Rmax.



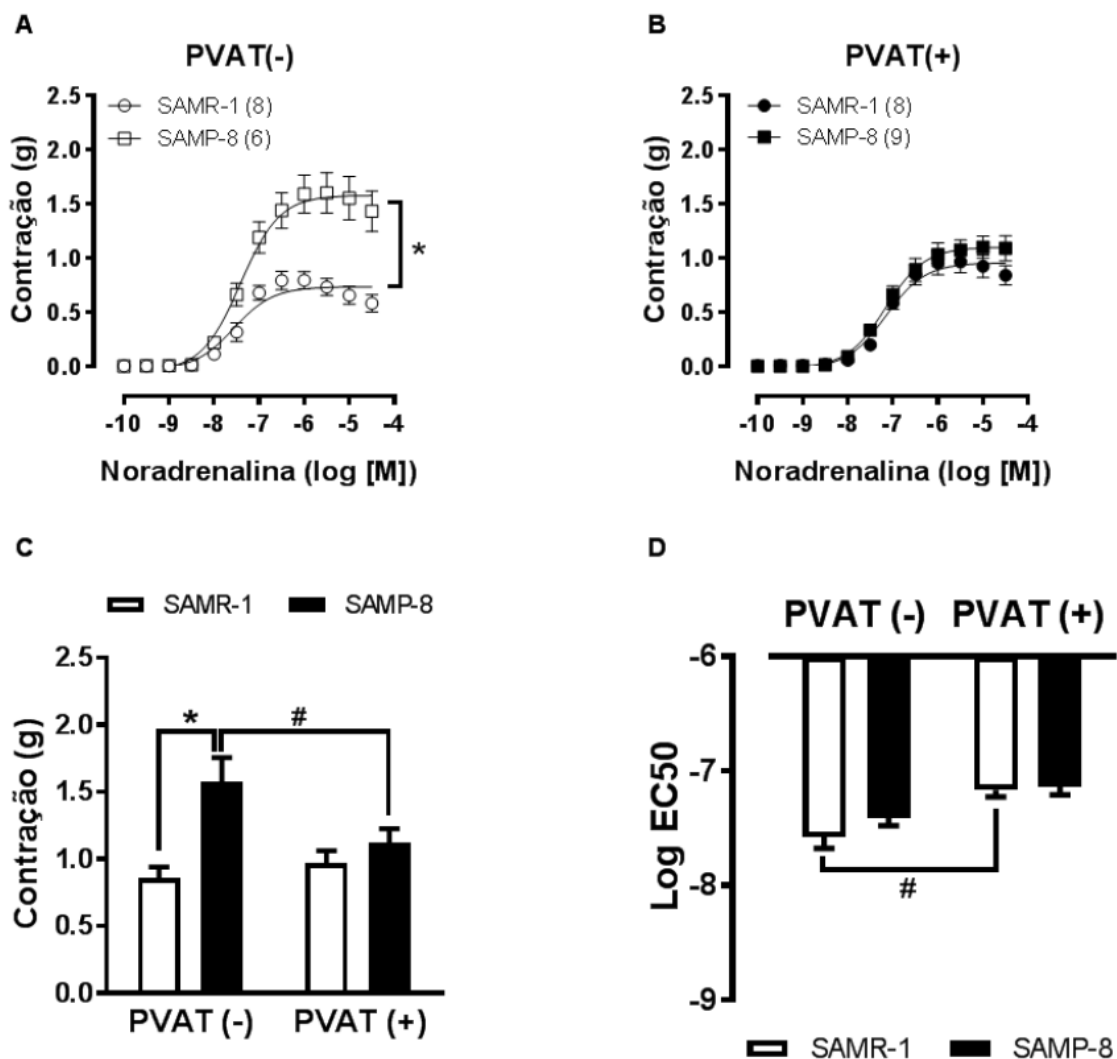
**Figura 9** - Curva concentração-resposta (A e B), resposta máxima (C) e sensibilidade (D, log EC50) para nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta torácica, na ausência do endotélio (E-) e com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivascular (PVAT) intacto, de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey: #  $P < 0,05$ , PVAT(+) versus PVAT(-). Número de animais avaliados encontra-se entre parênteses.

#### 4.4. Contração induzida por agonista adrenérgico e influência do PVAT em camundongos com 3 meses de idade

A noradrenalina promoveu contração dependente de concentração nos anéis de aorta torácica com endotélio de camundongos SAMP-8 e SAMR-1, tanto na ausência (PVAT-) quanto na presença (PVAT+) de PVAT (Figura 10A e 10B). A comparação entre as curvas para noradrenalina mostrou que a contração foi maior em anéis PVAT(-) de camundongos SAMP-8 em relação aos respectivos anéis de camundongos SAMR-1, mas não houve diferença entre os anéis PVAT(+) das duas linhagens (Figura 10A e 10B).

A contração foi menor em anéis PVAT(+) em relação a dos anéis PVAT(-) de camundongos SAMP-8, mas na linhagem SAMR-1 não houve diferença entre os anéis PVAT(-) e PVAT(+) (Figura 10C). A  $R_{max}$  em anéis PVAT(-) de camundongos SAMP-8 foi aumentada em relação a dos anéis PVAT(-) de camundongos SAMR-1 (**Figura 10C**). Porém, em anéis PVAT(+) de camundongos SAMP-8, a  $R_{max}$  foi similar a dos anéis PVAT(+) de camundongos SAMR-1 (**Figura 10C**). A  $R_{max}$  foi reduzida nos anéis PVAT(+) em relação aos anéis PVAT(-) nos animais SAMP-8, mas não houve diferença entre os anéis PVAT(-) e PVAT(+) da linhagem SAMR-1 (**Figura 10C**). O  $\log EC_{50}$  nos anéis PVAT(-) e PVAT(+) de camundongos SAMP-8 foi semelhante aos respectivos anéis de camundongos SAMR-1. Redução na sensibilidade ( $\log EC_{50}$ ) à noradrenalina foi observada nos anéis PVAT(+) em relação aos anéis PVAT(-) apenas na linhagem SAMR-1 (**Figura 10D**).

A contração induzida pelo KCl em aorta torácica não foi diferente entre as linhagens ou modificada pela presença do PVAT (SAMR-1, PVAT-:  $1,55 \pm 0,09$ ; SAMR-1, PVAT+:  $1,52 \pm 0,10$ ; SAMP-8, PVAT-:  $1,55 \pm 0,11$ ; SAMP-8, PVAT+:  $1,57 \pm 0,11$ ).



**Figura 10** - Curva concentração-resposta (A e B), resposta máxima (C) e sensibilidade (D, log EC50) para noradrenalina em anéis de aorta torácica, na presença do endotélio e com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivascular (PVAT) intacto, de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey: \*  $P < 0,05$ , SAMP-8 versus SAMR-1; #  $P < 0,05$ , PVAT(+) versus PVAT(-). Número de animais avaliados encontra-se entre parênteses.

#### 4.4.1. Modulação da contração pelo endotélio e NO em anéis sem e com PVAT

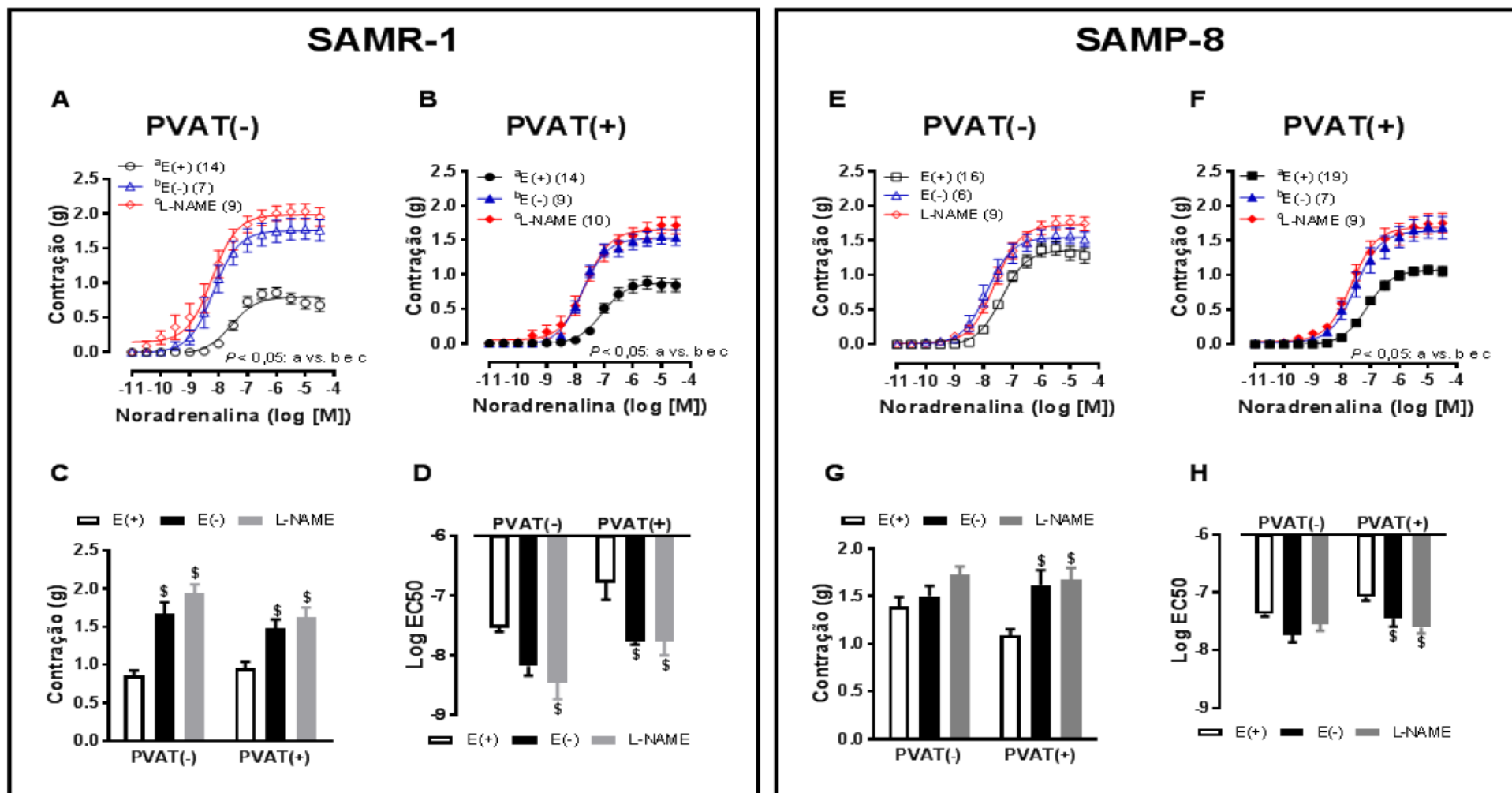
A comparação entre as curvas para noradrenalina nos anéis PVAT(-) e PVAT(+) do SAMR-1 mostrou que a remoção do endotélio (E-) e a incubação com L-NAME aumentaram a contração à noradrenalina em relação aos anéis com endotélio íntegro e não incubados com L-NAME (E+) (**Figura 11A e 11B**). A  $R_{max}$  e a sensibilidade (log EC50) em anéis PVAT(-) e PVAT(+) de camundongos SAMR-1 também foram aumentadas quando o endotélio foi removido e na presença de L-NAME (**Figura 11C e 11D**).

Na linhagem SAMP-8, a comparação das curvas para noradrenalina, assim

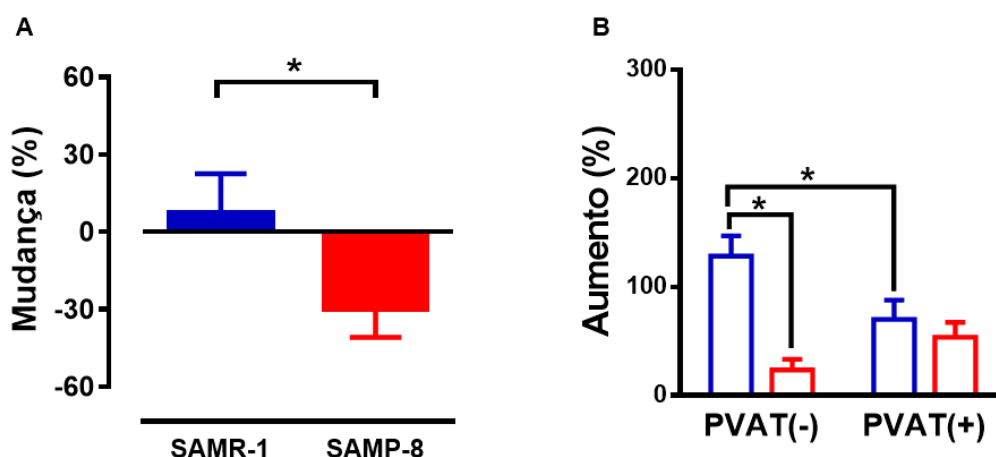
como a Rmax e a sensibilidade, mostraram que a remoção do endotélio (E-) e a incubação com L-NAME não modificaram a contração à noradrenalina em anéis PVAT(-) (**Figura 11E, 11G e 11H**). Entretanto, em anéis PVAT(+) do SAMP-8, a remoção do endotélio (E-) e a incubação com L-NAME aumentaram a contração à noradrenalina em relação aos anéis com endotélio íntegro e que não foram incubados com L-NAME (E+) (**Figura 11F, 11G e 11H**).

O aumento da contração à noradrenalina promovido pela incubação com L-NAME em anéis PVAT(-) de camundongos SAMP-8 foi menor do que aquele observado nos respectivos anéis de camundongos SAMR-1 (**Figura 12**). O efeito promovido pelo L-NAME foi semelhante entre os anéis PVAT(+) das duas linhagens. Esse efeito foi menor em anéis PVAT(+) em relação ao efeito observado em anéis PVAT(-) de camundongos SAMR-1, sendo que o efeito promovido pelo L-NAME foi semelhante em anéis PVAT(-) e PVAT(+) de camundongos SAMP-8 (**Figura 12**).





**Figura 11** - Curva concentração-resposta (A, B, E e F), resposta máxima (C e G) e sensibilidade (D e H, log EC50) para noradrenalina em anéis de aorta torácica, na presença (E+) e na ausência (E-) do endotélio e com (+) ou sem (-) tecido adiposo perivascular (PVAT) intacto e incubados com inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME), de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey: §  $P < 0,05$  versus seus respectivos anéis E(+). Número de animais avaliados encontra-se entre parênteses.



**Figura 12** - Porcentagem de aumento promovido pelo inibidor da síntese do óxido nítrico (L-NAME) nos anéis da aorta torácica, na presença de endotélio e com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivascular (PVAT) de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 aos 3 meses de idade. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey: \*  $P < 0,05$ , SAMP-8 versus SAMR-1; #  $P < 0,05$ , PVAT(+) versus PVAT(-). N = 9 animais/linhagem.

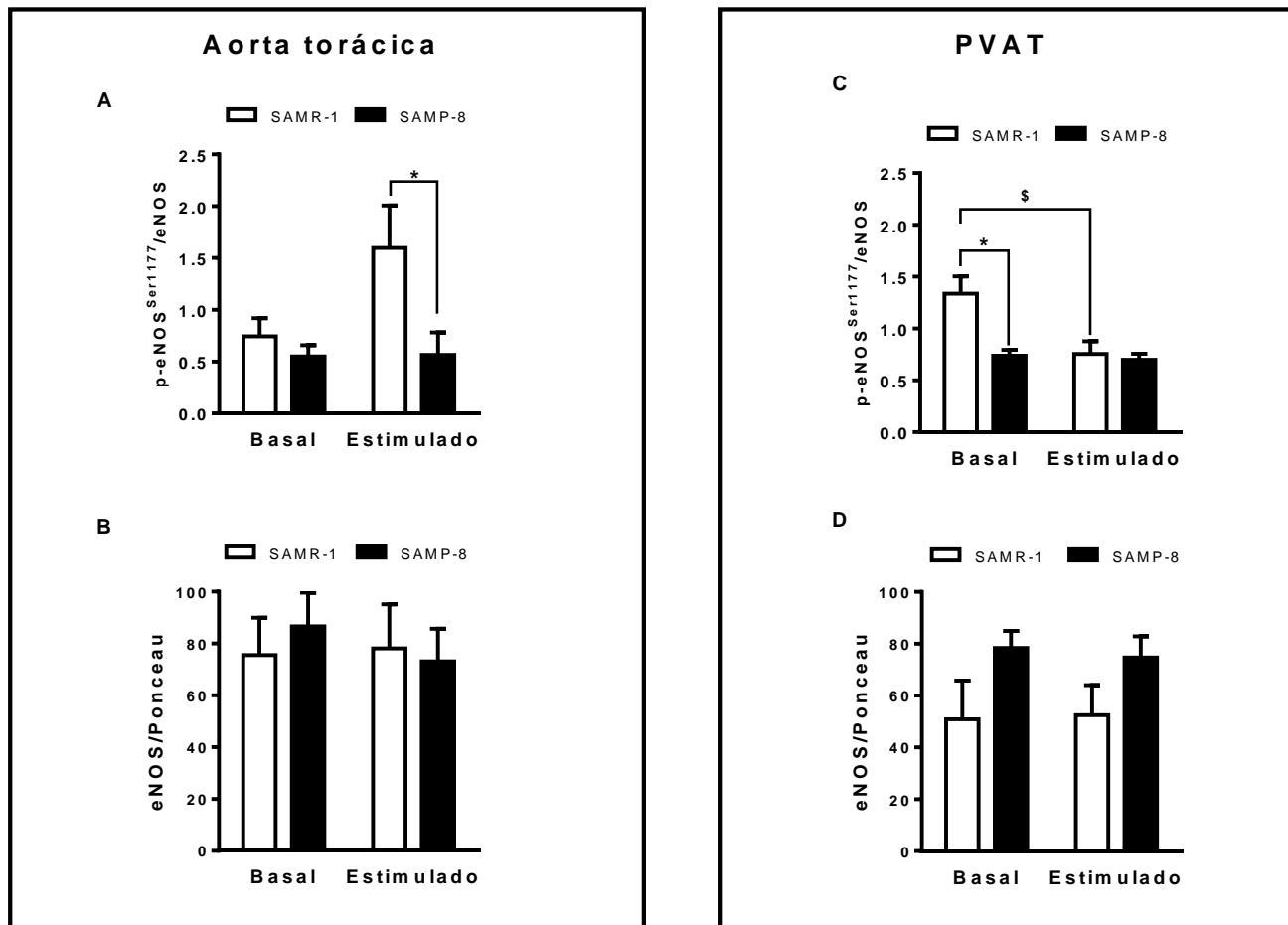
#### 4.5. Conteúdo proteico de eNOS e efeito do estímulo por noradrenalina sobre a fosforilação da eNOS em aorta torácica e PVAT

##### 4.5.1 AORTA

Não houve diferença no conteúdo proteico da eNOS total entre as aortas de camundongos SAMR-1 e SAMP-8. Não houve diferença na razão p-eNOS/eNOS entre as linhagens na situação basal, porém, sob estímulo com noradrenalina ( $10^{-5}$  M), a razão p-eNOS/eNOS foi reduzida em camundongos SAMP-8 em relação ao SAMR-1 (**Figura 13**). O estímulo com noradrenalina aumentou a fosforilação na serina<sup>1177</sup> da eNOS em aorta de camundongos SAMR-1 em relação à condição basal, mas não houve diferença significativa. Em aorta de camundongos SAMP-8, o estímulo com noradrenalina não modificou a razão p-eNOS/eNOS em relação à condição basal (**Figura 13**).

##### 4.5.2 PVAT

No PVAT, não houve diferença significativa do conteúdo proteico da eNOS total entre as linhagens. Na condição basal, a razão p-eNOS/eNOS no PVAT de camundongos SAMP-8 foi reduzida em relação a camundongos SAMR-1, mas, sob estímulo com noradrenalina, essa razão foi semelhante no PVAT das duas linhagens (**Figura 13**). O estímulo com noradrenalina reduziu a razão p-eNOS/eNOS no PVAT de camundongos SAMR-1 em relação à condição basal, mas não modificou essa razão no PVAT de camundongos SAMP-8 (**Figura 13**).

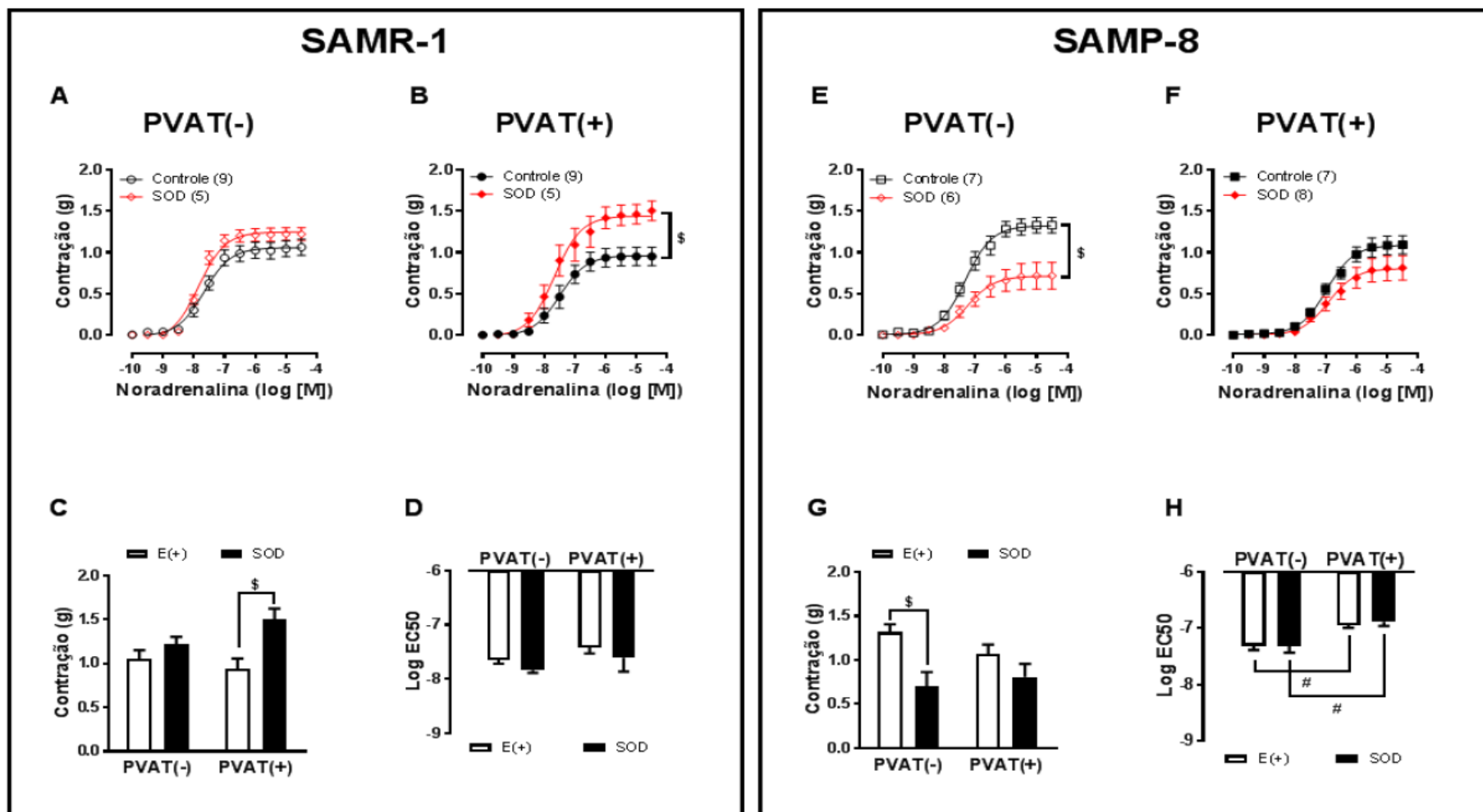


**Figura 13** - Conteúdo proteico da eNOS total (B e D) e fosforilada em serina<sup>1177</sup> (A e C) em aorta e PVAT, sem (basal) e com estímulo (estimulado) com noradrenalina, de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 aos 3 meses de idade. Os gráficos mostram a densidade óptica referente à banda da eNOS normalizada pela densidade óptica das bandas coradas com Ponceau e da eNOS fosforilada em serina<sup>1177</sup> normalizada pela eNOS total das respectivas amostras. As barras representam média  $\pm$  EPM. ANOVA-duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey: \*  $P < 0,05$ , SAMP-8 versus SAMR-1; §  $P < 0,05$ , estimulado versus basal.  $n = 5-6$  animais/grupo.

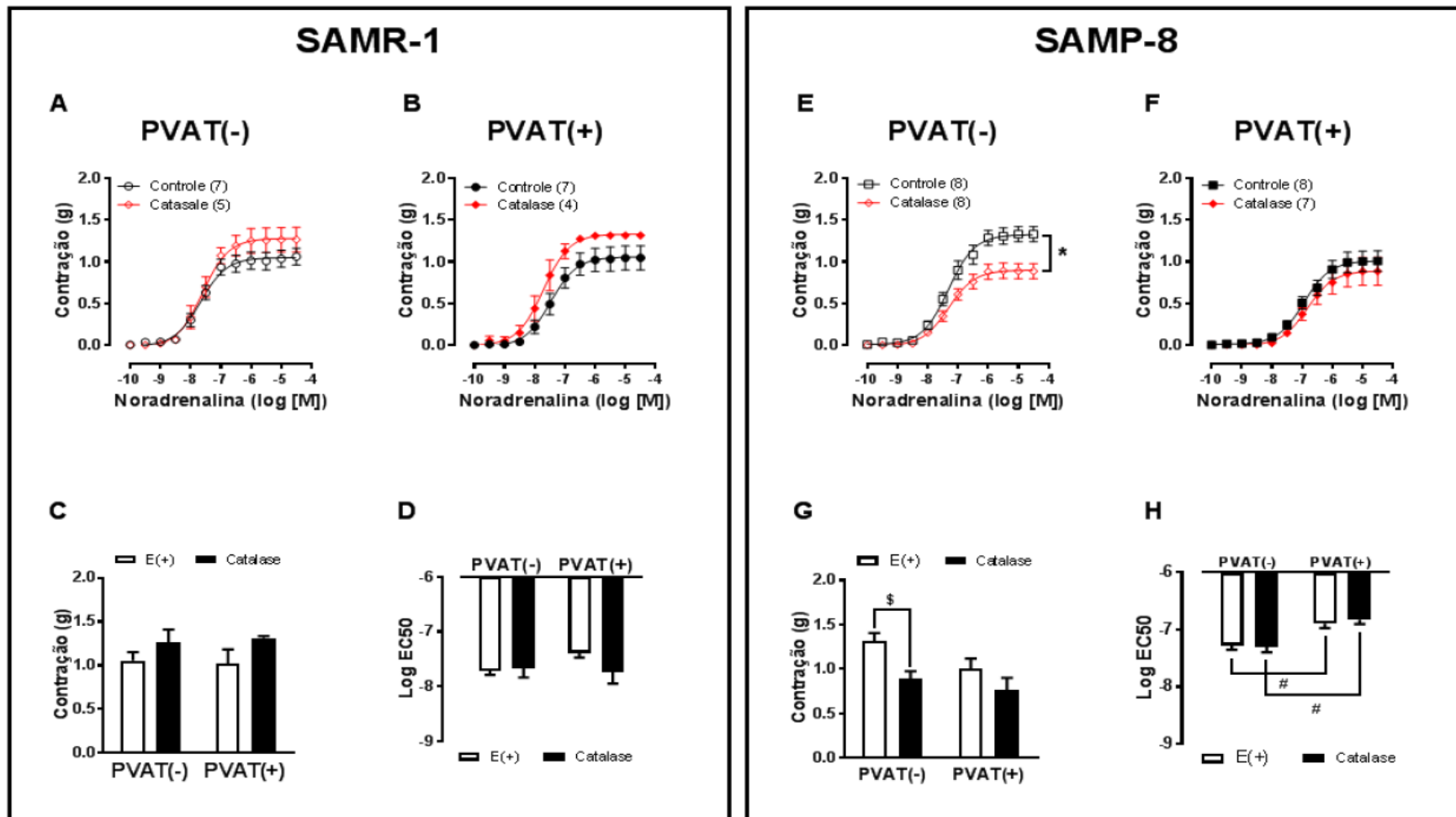
#### 4.6. Modulação da contração pelas EROs em anéis sem e com PVAT

A comparação das curvas, assim como da Rmax, mostrou que a incubação com SOD não alterou a resposta à noradrenalina nos anéis PVAT(-), porém aumentou essa resposta em anéis PVAT(+) de SAMR-1, em relação aos anéis controles que não foram incubados (controle) (**Figura 14**). Em animais SAMP-8, a incubação com a SOD dos anéis PVAT(-) reduziu a contração à noradrenalina. No entanto, nos anéis PVAT(+), a incubação com a SOD não alterou a resposta induzida pela noradrenalina (**Figura 14**).

Não houve diferença significativa da resposta à noradrenalina na ausência (controle) e presença de catalase, tanto em anéis PVAT(-) quanto PVAT(+) de camundongos SAMR-1 (**Figura 15**). Em animais SAMP-8, a incubação com catalase dos anéis PVAT(-) reduziu a contração à noradrenalina em relação aos anéis que não foram incubados (controle) (Figura 15). No entanto, a incubação com catalase não alterou a resposta dos anéis PVAT(+) do SAMP-8 (**Figura 15**).



**Figura 14** - Curva concentração-resposta (A, B, E e F), resposta máxima (C e G) e sensibilidade (D e H, log EC50) para noradrenalina em anéis de aorta torácica, com endotélio e com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivascular (PVAT) intacto e incubados com superóxido dismutase (SOD) ou não (controle), de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey:  $^{\$}P < 0,05$ , SOD versus controle,  $^{\#}P < 0,05$ , PVAT(+) versus PVAT(-). Número de animais avaliados encontra-se entre parênteses.



**Figura 15** - Curva concentração-resposta (A, B, E e F), resposta máxima (C e G) e sensibilidade (D e H, log EC50) para noradrenalina em anéis de aorta torácica, com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivasculare (PVAT) intacto e incubados ou não (controle) com catalase, de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey: \$ $P < 0,05$ , catalase versus controle, # $P < 0,05$  PVAT(+) versus PVAT(-). Número de animais avaliados encontra-se entre parênteses.

#### **4.7. Expressão das enzimas SOD e catalase e geração de ânion superóxido em aorta torácica e PVAT de camundongos de 3 meses de idade**

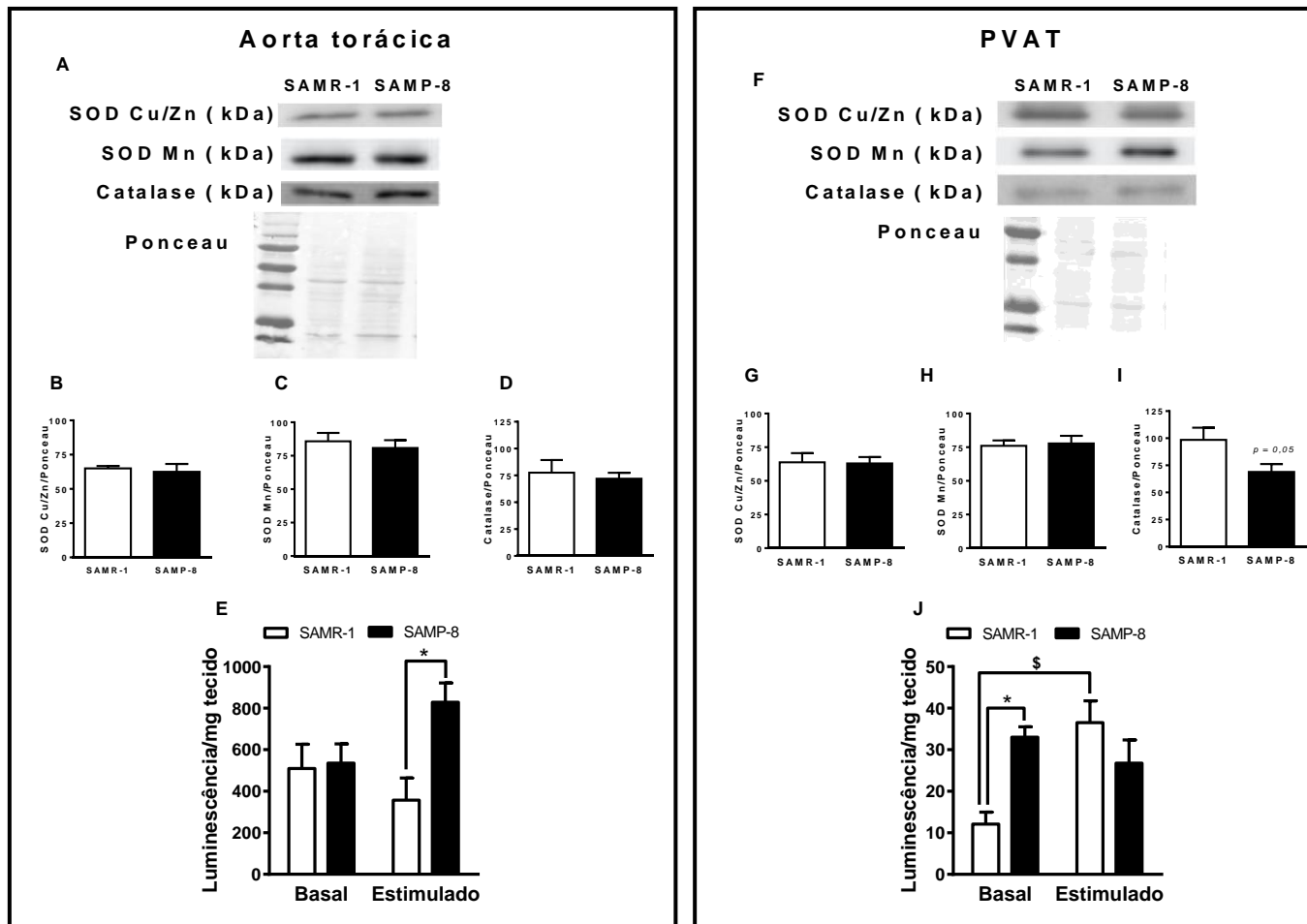
O conteúdo proteico da Cu/Zn-SOD e da Mn-SOD na aorta torácica e no PVAT foram semelhantes entre as linhagens (**Figura 16**). A expressão proteica da catalase foi semelhante em aortas torácicas de SAMR-1 e SAMP-8 e foi reduzida no PVAT dos animais SAMP-8 em relação ao SAMR-1, mas não houve diferença significativa (**Figura 16**).

Na condição basal, a geração de ânion superóxido em aorta torácica é semelhante em camundongos SAMP-8 e SAMR-1. Estímulo com noradrenalina não modificou a geração de ânion superóxido em aorta torácica de camundongos SAMR-1, mas aumentou a produção de ânion superóxido em aorta torácica de camundongos SAMP-8 (**Figura 16**).

No PVAT, a geração de ânion superóxido na condição basal foi aumentada em camundongos SAMP-8 em relação aos camundongos SAMR-1 (**Figura 16**). Não houve diferença significativa na geração de ânion superóxido no PVAT sob estímulo com noradrenalina entre as linhagens, pois o estímulo aumentou a geração de ânion superóxido no PVAT de camundongos SAMR-1 em relação à condição basal (**Figura 16**). Contudo, é necessário aumentar o “n” amostral para a condição estimulada dessa linhagem (n = 3).

#### **4.8. Modulação da contração pelos produtos da COX em anéis sem e com PVAT**

A incubação com indometacina não alterou a resposta à noradrenalina nos anéis PVAT(-) e PVAT(+) de animais SAMR-1 e SAMP-8 (**Figura 17**).



**Figura 16** - Conteúdo proteico das isoformas da superóxido dismutase (SOD), SOD-Cu/Zn (B e G) e SOD-Mn (C e H), e da catalase (D e I) e geração de ânion superóxido na condição basal e com estímulo de noradrenalina (E e J) em aorta e PVAT de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 aos 3 meses de idade. Imagens representativas do *blotting* e da respectiva membrana corada com Ponceau (A e F). Os gráficos mostram a densidade ótica referente à banda das enzimas normalizada pela densidade ótica das bandas coradas com Ponceau das respectivas amostras e a luminescência emitida pela lucigenina normalizada pela massa do tecido. As barras representam média  $\pm$  EPM. ANOVA-duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey: \*  $P < 0,05$ , SAMP-8 versus SAMR-1; \$  $P < 0,05$ , estimulado versus basal.  $n = 3-6$  animais/grupo.



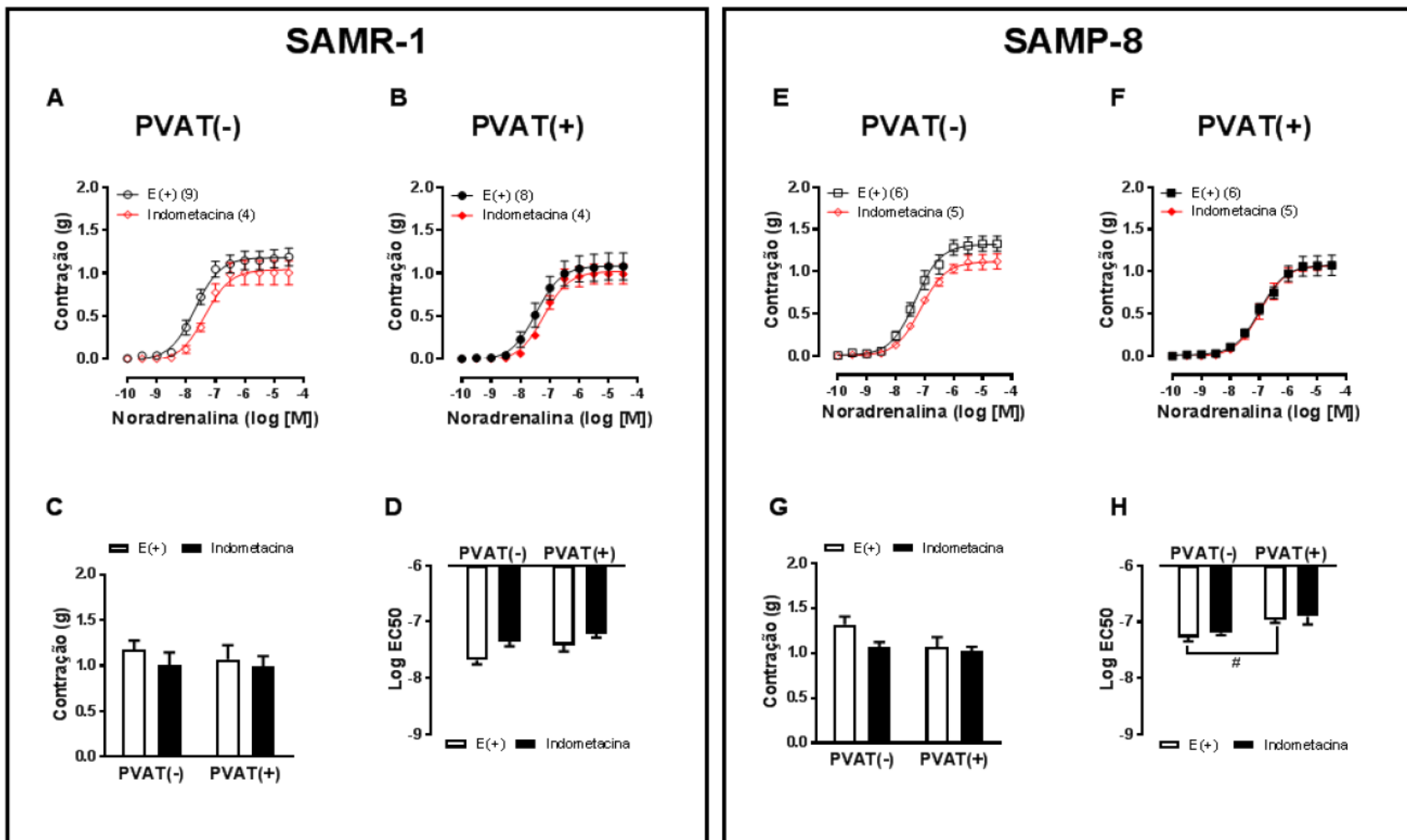


Figura 17 - Curva concentração-resposta (A, B, E e F), resposta máxima (C e G) e sensibilidade (D e H, log EC50) para noradrenalina em anéis de aorta torácica, com (PVAT+) ou sem (PVAT-) tecido adiposo perivascular (PVAT) intacto e incubados ou não (controle) com indometacina, de camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. ANOVA de duas vias com pós-teste de Tukey. Número de animais avaliados encontra-se entre parênteses.

## 5. DISCUSSÃO

As principais dificuldades dos estudos experimentais da biologia vascular durante o envelhecimento são o tempo de espera para o animal envelhecer e o uso de animais em diferentes idades, que pode dificultar a interpretação dos resultados (Folkow e Svanborg 1993; Küng e Lüscher 1995; Ziemann *et al.*, 2001; Zhou e Frohlich, 2003; Llorens *et al.*, 2005). Camundongos SAMP-8 envelhecem de forma acelerada e previsível, uma vantagem que permite que o trabalho experimental seja realizado em um tempo conveniente e padrão.

Em fêmeas da linhagem SAMP-8, sabemos que as alterações vasculares similares às observadas com o envelhecimento cronológico aparecem a partir dos 6 meses de idade (Novella *et al.*, 2010; Novella *et al.*, 2013). Apesar de machos dessa linhagem também apresentarem alterações da reatividade vascular aos 6-7 meses de idade (Lloréns *et al.*, 2007), a avaliação temporal dessas alterações só foram bem caracterizadas em fêmeas. Sabendo que fêmeas de camundongos SAMP-8 apresentam menor déficit de memória do que machos na mesma idade (Flood *et al.*, 1995), sendo que os machos já apresentam discreta alteração aos dois meses de idade (Miyamoto *et al.*, 1986), que os hormônios sexuais femininos conferem proteção no sistema vascular (Dantas *et al.*, 2002; Ong *et al.*, 2008), caracterizamos as alterações vasculares e a ação anticontrátil do PVAT em machos de camundongos SAMP-8 com 3 meses de idade. No presente estudo, demonstramos que, em machos da linhagem SAMP-8, alterações vasculares semelhantes àquelas que ocorrem no processo de envelhecimento humano, como aumento da vasoconstrição e redução da vasodilatação à acetilcolina, foram expressas já aos 3 meses de idade. Assim, este modelo pode ser útil na investigação das alterações vasculares relacionadas ao envelhecimento.

Em nosso estudo, a glicemia e a concentração de colesterol e triglicerídeos no plasma não foram diferentes entre os camundongos SAMR-1 e SAMP-8 de 3 meses de idade. Da mesma forma, o índice de Lee e os depósitos de gordura não foram diferentes entre as linhagens, o que descarta uma possível contribuição das alterações metabólicas para a disfunção vascular observada em camundongos SAMP-8. Além disso, não avaliamos a pressão arterial em nosso estudo, mas em um trabalho publicado por Reed e colaboradores (2011) foi observado que, aos 3 meses de idade, a pressão arterial não estava alterada em machos SAMP-8,

sugerindo, assim, que mudanças na reatividade vascular da aorta torácica precedem o aumento da pressão arterial associado ao envelhecimento, semelhante ao que foi encontrado em fêmeas SAMP-8 (Novella *et al.*, 2013a; Novella *et al.*, 2013b; Vidal-Gomez *et al.*, 2016).

Os resultados do presente estudo mostram que camundongos SAMP-8 machos aos 3 meses de idade apresentaram disfunção endotelial, mostrada pela redução do relaxamento dependente do endotélio e a ausência de modulação da contração pela remoção do endotélio e inibição da síntese de NO nos anéis PVAT(-). O fato da resposta ao doador de NO não estar alterada em aorta torácica reforça a presença de disfunção endotelial, mais do que redução da capacidade do músculo liso de responder aos fatores endoteliais, em camundongos SAMP-8. Disfunção endotelial com capacidade preservada do músculo liso vascular de responder ao NO também é observada com o envelhecimento natural em animais (Taddei *et al.*, 1995, 1997; Gerhard *et al.*, 1996) e humanos (Rodríguez-Mañas, 2009).

Em relação às fêmeas da linhagem SAMP-8, a disfunção endotelial nos machos aparece mais precocemente, uma vez que em fêmeas observa-se tal alteração a partir dos 6 meses de idade (Novella *et al.*, 2013), que corrobora dados da literatura em que o envelhecimento é associado a uma disfunção endotelial que ocorre de forma precoce em homens comparado às mulheres (Celermajer *et al.*, 1994).

O NO é o fator mais importante envolvido na regulação endotelial da função vascular e tem ações vasoprotetoras como: vasodilatação/modulação negativa da contração e inibição da proliferação e migração de CMLs, adesão de leucócitos e agregação plaquetária (Xia e Föstermann, 2015). Redução da disponibilidade de NO ocorre no envelhecimento (Barton *et al.*, 1997; Cernadas *et al.*, 1998; Van der Loo *et al.*, 2000) e o mesmo ocorre no modelo de envelhecimento acelerado SAMP-8. Diferente ao observado em machos da linhagem SAMR-1 (controle, que não apresenta envelhecimento acelerado), a inibição da NOS com L-NAME não aumentou a contração de maneira significativa em aorta torácica de machos da linhagem SAMP-8 de 3 meses de idade, indicando redução da disponibilidade de NO. Reforçando esses achados, a fosforilação da eNOS em serina<sup>1177</sup> após estímulo com noradrenalina foi reduzida em aorta torácica de machos SAMP-8 em relação aos machos SAMR-1. Fêmeas SAMP-8 apresentaram diminuição da produção do

NO e da expressão gênica e proteica da eNOS apenas aos 6 meses de idade (Novella *et al.*, 2013b).

Juntamente com o comprometimento da biodisponibilidade do NO, os vasoconstritores derivados da COX medeiam a contração aumentada à fenilefrina em camundongos SAMP-8 fêmeas e ratos machos Sprague-Dawley velhos (Briones *et al.*, 2005; Vidal-Gómez *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017). Diferentemente, em camundongos SAMP-8 machos, os fatores derivados da COX não modulam o aumento da vasoconstrição à noradrenalina em aorta torácica, mostrando que os mecanismos que levam às alterações vasculares podem variar entre fêmeas e machos e de acordo com o agonista vasoconstritor utilizado.

Além dos prostanoídes derivados da enzima COX, aumento na geração de EROs, principalmente o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (Brandes *et al.*, 2005), inclusive EROS mitocondriais (Sohal *et al.*, 1994; Sohal *et al.*, 2002), pode estar envolvido no aumento da vasoconstrição observada no envelhecimento. O ânion superóxido ganha destaque por sua capacidade de reduzir a biodisponibilidade de NO (Gryglewski *et al.*, 1986), transformando-o em peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que é citotóxico e não possui ação vasodilatadora.

O peroxinitrito é considerado uma espécie reativa do nitrogênio por causa da sua alta reatividade com proteínas, DNA e lipídios. Ao contrário do ânion superóxido, o peroxinitrito é mais estável e penetra na célula causando modificações oxidativas de macromoléculas, especialmente lipídios, DNA e proteínas via reações de nitração de resíduos de tirosina e cisteína ou via mecanismos mediados por radicais indiretos (Gryglewski *et al.*, 1986; Radi *et al.*, 1991).

A SOD, descoberta por Mc Cord e Fridovich em 1969, tem papel fundamental na defesa do organismo contra as EROs, pois atua na remoção do radical superóxido. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio molecular e/ou peróxido de hidrogênio. Por sua vez, a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Gaetani *et al.*, 1989). O peróxido de hidrogênio promove uma resposta ambígua no sistema vascular, sendo considerado um EDHF e tendo um papel vasodilatador (Matoba *et al.*, 2000, 2002) ou sendo um vasoconstritor, dependendo da sua concentração (Gao, *et al.*, 2003). O peróxido de hidrogênio é uma EROs e na presença de metais de transição catalítica (ex: Fe<sup>2+</sup>) pode produzir uma espécie altamente reativa, o radical hidroxila

(Sindler *et al.*, 2012).

Ao avaliarmos os possíveis mecanismos envolvidos nesta disfunção endotelial e na vasoconstrição aumentada apresentada pelos machos SAMP-8 de 3 meses de idade, observamos que, além da fosforilação da eNOS estar reduzida, a produção de ânion superóxido está aumentada na aorta torácica estimulada com noradrenalina, um indício de que há um desequilíbrio na produção de EROS na aorta desses camundongos. Esse dado corrobora os resultados da reatividade vascular, em que observamos que ânion superóxido e peróxido de hidrogênio medeiam o aumento da vasoconstrição à noradrenalina em aorta torácica de camundongos SAMP-8. Lloréns e colaboradores (2007) observaram acúmulo do marcador de peroxidação lipídica e estresse oxidativo, malonaldeído (MDA), em aortas de camundongos machos SAMP-8 aos 6-7 meses de idade. Nosso estudo mostra que pode haver estresse oxidativo em aorta torácica já aos 3 meses de idade. Apesar do aumento da geração de EROs, não há alteração da expressão das enzimas antioxidantes Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e catalase na aorta torácica de camundongos SAMP-8. Apesar de ter sido demonstrado uma redução, em função da idade, de enzimas antioxidantes Mn-SOD e catalase no córtex cerebral de camundongos SAMP-8 (Sato *et al.*, 1996; Kurokawa *et al.*, 2001), este processo parece ser diferente no sistema vascular. Além disso, em arteríolas do músculo esquelético de ratos Fischer 344 velhos (22 meses de idade) também não houve redução do conteúdo proteico de Cu/Zn-SOD (Semsei *et al.*, 1991).

Apesar da disfunção endotelial em machos SAMP-8 de 3 meses de idade, o PVAT da aorta torácica parece estar funcional, pois observamos efeito anticontrátil sobre a vasoconstrição induzida pela noradrenalina. De maneira inesperada, não foi observado um efeito anticontrátil do PVAT da aorta torácica de machos SAMR-1 de 3 meses de idade.

O efeito anticontrátil promovido pelo PVAT da aorta torácica observado em machos SAMP-8 de 3 meses de idade parece ser dependente do endotélio, pois a remoção simultânea do endotélio e do PVAT aumentou a contração à noradrenalina, mas esse aumento foi de mesma magnitude daquele promovido pela remoção não simultânea dos tecidos, ou seja, o efeito não foi somatório. A participação do endotélio no efeito anticontrátil promovido pelo PVAT não é clara. Enquanto Victorio e colaboradores (2016) mostraram que o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT da

aorta torácica de ratos Wistar de 3-4 meses de idade sobre a resposta à fenilefrina não foi dependente do endotélio, Gao e colaboradores (2007), também avaliando o efeito anticontrátil em aorta torácica de ratos Wistar (300-350 g) sobre a resposta à fenilefrina, demonstraram que o PVAT promove efeito anticontrátil de maneira dependente e independente do endotélio. O mecanismo dependente do endotélio envolve a liberação de um ADRF, que induz relaxamento dependente do endotélio por meio da liberação de NO e ativação subsequente dos canais para potássio dependentes de cálcio, enquanto o mecanismo independente envolve peróxido de hidrogênio e ativação de GCs (Gao *et al.*, 2007).

Em diferentes estudos sobre a função anticontrátil do PVAT, o NO se mostrou estar envolvido neste efeito em artérias mesentéricas em resposta à noradrenalina (Gil-Ortega *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2013; Gil-Ortega *et al.*, 2014) e aorta torácica em resposta à fenilefrina (Löhn *et al.*, 2002; Dubrovská *et al.*, 2003; Victorio *et al.*, 2016). Ao avaliarmos a modulação promovida pelo NO da vasoconstrição à noradrenalina na presença do PVAT de machos SAMP-8, observamos que o NO que modula a resposta vasoconstritora parece ser proveniente do endotélio, pois não houve diferença significativa do efeito promovido pela inibição da NOS com L-NAME em anéis PVAT(-) e PVAT(+). Além disso, não houve um aumento da fosforilação da eNOS no PVAT estimulado com noradrenalina em camundongos SAMP-8. Portanto, NO parece não participar do efeito anticontrátil promovido pelo PVAT da aorta torácica sobre a resposta à noradrenalina em machos SAMP-8 de 3 meses idade. Contudo, experimento adicional avaliando o efeito da inibição da NOS em anéis PVAT(+) sem endotélio deverá ser realizado para confirmar esse dado.

A ausência de um efeito anticontrátil do PVAT de aorta torácica de camundongos SAMR-1 de 3 meses de idade é inesperada, uma vez que esse efeito já foi demonstrado em diversos vasos sanguíneos e espécies (Löhn *et al.*, 2002; Dubrovská *et al.*, 2004; Verlohren *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005; Dashwood *et al.*, 2007; Malinowski *et al.*, 2008; Victorio *et al.*, 2016; Nóbrega *et al.*, 2019). Contudo, a ausência do efeito anticontrátil do PVAT de aorta torácica de camundongos SAMR-1 pode ser explicado pelo fato que o estímulo com noradrenalina promoveu redução da fosforilação da eNOS em serina<sup>1177</sup> (resíduo que quando fosforilado aumenta a atividade da enzima), mesmo estímulo que aumentou a fosforilação dessa enzima na aorta torácica.

O PVAT da veia safena atenua a contração induzida por noradrenalina liberando PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> e essas prostaglandinas podem atuar como ADRF (Ozen *et al.*, 2013). Porém, ao avaliarmos a modulação dos produtos da COX na vasoconstrição por noradrenalina em anéis com PVAT, o efeito anticontrátil do PVAT não foi alterado, de modo que os fatores derivados da COX parecem não estar envolvidos nesse efeito em camundongos SAMP-8.

Apesar do seu efeito ambíguo, o peróxido de hidrogênio exerce seu efeito vasodilatador por promover hiperpolarização direta, atuando diretamente sobre canais para potássio sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>) ou canais para potássio ativados pelo cálcio (K<sub>Ca</sub><sup>2+</sup>) (Wei *et al.*, 1996; Lacza *et al.*, 2002). Peróxido de hidrogênio foi descrito mediar o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT da aorta torácica de ratos Wistar (Gao *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2016) e camundongos Balb/c (Nóbrega *et al.*, 2019) de 3 meses de idade. Porém, ao avaliarmos a modulação da resposta contrátil pelo peróxido de hidrogênio em anéis PVAT(+), a partir da incubação com catalase ou aumento da dismutação de ânion superóxido em peróxido de hidrogênio com incubação com SOD, não observamos alteração na resposta em anéis PVAT(+) de camundongos SAMP-8, e, portanto, o peróxido de hidrogênio também parece não estar envolvido no efeito anticontrátil do PVAT desses animais. Além disso, qualquer que seja o mediador desse efeito anticontrátil, sua ação não é comprometida e não envolve metabolismo de ânion superóxido, pois a incubação com SOD não alterou esse efeito e a geração de ânion superóxido está aumentada no PVAT de camundongos SAMP-8. De maneira também inesperada, em camundongos SAMR-1, a incubação com SOD aumentou a contração induzida pela noradrenalina em anéis PVAT(+) e o estímulo com noradrenalina aumentou a geração de ânion superóxido no PVAT, indicando que maior acúmulo de peróxido de hidrogênio possa potencializar a resposta contrátil. Além disso, esse aumento da geração de ânion superóxido também pode explicar a ausência de um efeito anticontrátil do PVAT de camundongos SAMR-1. Contudo, experimentos adicionais são necessários para confirmar esses dados.

A noradrenalina é uma catecolamina de ocorrência natural que funciona como um neurotransmissor no sistema nervoso simpático. A noradrenalina estimula diretamente os receptores adrenérgicos de forma não seletiva. O receptor adrenérgico β<sub>3</sub> é expresso principalmente no endotélio e no tecido adiposo, tanto o

tecido adiposo marrom quanto o branco (Nahmias *et al.*, 1991; Krief *et al.*, 1993). Evidências indicam que a ativação do receptor adrenérgico  $\beta_3$  está envolvida no efeito anticontrátil do PVAT (Weston *et al.*, 2013; Saxton *et al.*, 2018).

Weston e colaboradores (2013) observaram que o CL-316,243 (um agonista seletivo de receptor  $\beta_3$ -adrenérgico) promove liberação de adiponectina pelos adipócitos, que hiperpolariza os miócitos de vasos mesentéricos de ratos Sprague-Dawley, por ativar os canais de potássio de alta condutância dependente de cálcio ( $BK_{Ca}$ ). Além disso, o mesmo grupo mostrou que a ativação elétrica dos nervos simpáticos no PVAT estimula a liberação de um fator anticontrátil dependente da ativação do receptor  $\beta_3$ -adrenérgico e de adiponectina (Saxton *et al.*, 2018).

Em aortas de camundongos desprovidas de PVAT, o tratamento com isoproterenol (agonista  $\beta$ -adrenérgico) aumenta a resposta contrátil à fenilefrina e está associado à elevada geração de EROs e à redução da biodisponibilidade de NO (Davel *et al.*, 2006 e 2014 e 2016; Xu *et al.*, 2008). Além disso, o nível de ânion superóxido derivado da NADPH oxidase na parede arterial está correlacionado com o aumento da expressão do gene ADIPOQ no PVAT que circunda o vaso, aumentando a produção de adiponectina (Antonopoulos *et al.*, 2015).

A modulação da função vascular pelo PVAT não se limita à secreção de fatores relaxantes. O PVAT da aorta e de artérias mesentéricas pode ter um reservatório funcional de catecolaminas (Ayala-Lopez *et al.*, 2014). O trabalho de Soltis e Cassis (1991) mostrou que o efeito anticontrátil do PVAT era abolido com a inibição da captação de noradrenalina com desipramina. Além disso, o PVAT de artérias mesentéricas de ratos Sprague-Dawley expressa o transportador de cátions orgânicos 3 (OCT3) (Ayala-Lopez *et al.*, 2015), que parece estar envolvido no efeito anticontrátil do PVAT, pois a inibição desse transportador abole o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT de artérias mesentéricas de camundongos C57Bl/6 (Saxton *et al.*, 2018).

Assim, pode ser provável que, em camundongos SAMP-8, a sinalização de receptores  $\beta$ -adrenérgicos na aorta torácica está disfuncional, aumentando a produção de ânion superóxido e favorecendo aumento da vasoconstrição à noradrenalina, mas, um efeito anticontrátil do PVAT sobre a resposta à noradrenalina é mantido pela ativação de receptores  $\beta_3$ -adrenérgicos funcionais nesse tecido e ação da adiponectina como ADRF. Contudo, experimentos adicionais



precisam ser realizados para comprovar essa hipótese.

## **6. CONCLUSÃO**

Em resumo, nosso estudo mostrou que:

1) o endotélio de camundongos SAMP-8 machos está disfuncional aos 3 meses de idade;

2) redução da ativação da eNOS e maior geração de ânion superóxido parecem contribuir para o aumento da contração da aorta torácica de camundongos SAMP-8 aos 3 meses de idade;

3) apesar da disfunção endotelial, o PVAT de camundongos SAMP-8 de 3 meses de idade exerce ação anticontrátil;

4) a presença do PVAT evidencia a modulação negativa da contração pelo NO endotelial;

5) o efeito anticontrátil promovido pelo PVAT de camundongos SAMP-8 parece não envolver NO e produtos da cicloxigenase e o mecanismo envolvido não é prejudicado pela maior geração de ânion superóxido no PVAT.

6) redução da ativação da eNOS e maior geração de ânion superóxido no PVAT de camundongos SAMR-1 podem explicar a falta da ação anticontrátil nessa linhagem.

Diante de todos os nossos dados, podemos concluir que, em camundongos SAMP-8 machos de 3 meses de idade, a ação anticontrátil do PVAT aparece como um mecanismo compensatório à redução da modulação endotelial no controle do tônus vascular e que não envolve NO e produtos da cicloxigenase, mas é dependente da presença do endotélio.

## **7. REFERÊNCIAS**

AFILALO J, KARUNANANTHAN S, EISENBERG MJ, ALEXANDER KP, BERGMAN H. Role of frailty in patients with cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. Volume 103 , Issue 11 , 1616 – 1621, 2009. Doi: 10.1016/j.amjcard.

AGHAMOHAMMADZADEH R and HEAGERTY AM. Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. *Ann Med*.44(suppl 1):S74–S84, 2012.

AGHAMOHAMMADZADEH R, UNWIN RD, GREENSTEIN AS, HEAGERTY AM. Effects of obesity on perivascular adipose tissue vasorelaxant function: nitric oxide,

inflammation and elevated systemic blood pressure. *J. Vasc. Res.* 52: 299–305, 2015.

[L  
SEPI]

AGHAMOHAMMADZADEH, R., WITHERS, S., LYNCH, F., GREENSTEIN, A., MALIK, R., HEAGERTY, A. Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 670–682, 2012. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01479.x>.

AKOUMIANAKIS, I.; TARUN, A.; ANTONIADES, C. Perivascular adipose tissue as a regulator of vascular disease pathogenesis: identifying novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol.* Oct;174(20):3411-3424, 2017. doi: 10.1111/bph.13666.

ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593–615, 2001.

ALMABROUK, T. A. M., UGUSMAN, A. B., KATWAN, O. J., SALT, I. P., AND KENNEDY, S. Deletion of AMPK $\alpha$ 1 attenuates the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) and reduces adiponectin release. *British Journal of Pharmacology*, 174: 3398–3410, 2017. doi: [10.1111/bph.13633](http://doi.org/10.1111/bph.13633).

ALMABROUK, T. A. M.; EWART, M. A.; SALT I. P.; KENNEDY, S. Perivascular fat and vascular diseases. *British Journal of Pharmacology* 171 595–617, 2014.

ANDREW P. J., MAYER B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* 43 (1999) 521–531.

ASSERSEN KB, JENSEN PS, BRIONES AM, RASMUSSEN LM, MARCUSSEN N, TOFT A, VANHOUTTE PM, JENSEN BL, HANSEN PBL. Periarterial fat from two human vascular beds is not a source of aldosterone to promote vasoconstriction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1;315(6):F1670-F1682 Dec 2018. doi: 10.1152/ajprenal.00391.2018.

BAGI, Z.; FEHER, A.; CASSUTO, J. Microvascular responsiveness in obesity: implications for therapeutic intervention. *British Journal of Pharmacology*, v. 165, n. 3, p. 544-560, 2012.

BALLIGAND J.-L., FERON O., DESSY C. [eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues](#). *Physiological Reviews* 89:2, 481-534, 2009.

BALTIERI N, GUIZONI DM, VICTORIO JA, DAVEL AP. Protective Role of Perivascular Adipose Tissue in Endothelial Dysfunction and Insulin-Induced Vasodilatation of Hypercholesterolemic LDL Receptor-Deficient Mice. *Front Physiol.* 2018 Mar 19;9:229. doi: 10.3389/fphys.2018.00229. eCollection 2018.

BARLOW RS, EL-MOWAFY AM, WHITE RE. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opens BKCa channels via the PLA<sub>2</sub>-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *American Journal of Physiology Heart and Circulation Physiology* 279:H457-H483, 2000.

BARODKA, V. M., JOSHI, B. L., BERKOWITZ, D. E., HOGUE, C. W., NYHAN, D. Implications of Vascular Aging. *Anesthesia and Analgesia*, 112(5), 1048–1060, 2011. <http://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182147e3c>.

BARTON M, COSENTINO F, BRANDES RP, MOREAU P, SHAW S, LÜSCHER TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension*. 30(4):817-24,1997.

BENJAMIN EJ, BLAHA MJ, CHIUVE SE, CUSHMAN M, DAS SR, DEO R, *ET AL*. Heart Disease and Stroke Statistics—2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 135:e1–e458, 2017. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000485.

BENKHOFF, S., A.E. LOOT, I. PIERSON, *ET AL*. Leptin potentiates endothelium-dependent relaxation by inducing endothelial expression of neuronal NO synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 32: 1605–1612, 2012.

BLACKBURN, E.H.; GREIDER, C.W.; SZOSTAK, J.W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature Medicine*, v. 12, p. 1133–1138, october, 2006.

BLASCO, M.A. Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chemical Biology*, v. 3, p. 640–649, 2007.

BLAUSEN. Blausen.com staff (2014). "[Medical gallery of Blausen Medical 2014](https://www.blausen.com/wiki/journal-of-medicine/2014.010)". *Wiki Journal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436)

BOLOTINA VM, NAJIBI S, PALACINO JJ, PAGANO PJ, COHEN RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 28;368(6474):850-3, 1994.

BOLUS WR and HASTY AH. Contributions of Innate Type 2 Inflammation to Adipose Function. *J Lipid Res*. 2018 Jun 11. pii: jlr.R085993. doi: 10.1194/jlr.R085993.

BOURQUE, S.L.; DAVIDGE, S.T.; ADAMS, M. A. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 300 (6), p.R1288-95, 2011.

BOYLE JG, LOGAN PJ, EWART MA, REIHILL JA, RITCHIE SA, CONNELL JM *ET AL*. Rosiglitazone stimulates nitric oxide synthesis in human aortic endothelial cells via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 283: 11210–11217, 2008.

BRANDES RP, SCHMITZ-WINNENTHAL FH, FÉLÉTOU M, GÖDECKE A, HUANG PL, VANHOUTTE PM, FLEMING I, BUSSE R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild type and endothelial NO synthase knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97: 9747–9752, 2000.

BRANDES, R.P., FLEMING, I., BUSSE, R. Endothelial aging. *Cardiovasc. Res*. 6,

286–294, 2005.

BRETT D. S., HWANG P. M., GLATT C. E., LOWENSTEIN C., REED R. R., SNYDER S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 27;351(6329):714-8, 1991.

BRETT DS, SNYDER SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulinrequiring enzyme. *Proc Nat Acad Sci USA*. 87:682– 685, 1990.

BRIONES A. M.; MONTOYA N.; GIRALDO J.; VILA E. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidative stress enzymes expression differently in mesenteric resistance arteries. *Autonomic & Autacoid, Pharmacology* 25: 155–162, 2005.

BRIONES AM, NGUYEN DINH CAT A, CALLERA GE, YOGI A, BURGER D, HE Y, CORRÊA JW, GAGNON AM, GOMEZ-SANCHEZ CE, GOMEZ-SANCHEZ EP, SORISKY A, OOI TC, RUZICKA M, BURNS KD, TOUYZ RM. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension*. May;59(5):1069-78, 2012. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.190223.

BROWN N.K., ZHOU Z., ZHANG J., ZENG R., WU J., EITZMAN D.T., CHEN Y.E., CHANG L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1621-1630, 2014.

BURKEWITZ, K., ZHANG, Y., MAIR, W. B. AMPK at the Nexus of Energetics and Aging. *Cell Metabolism*, 20(1), 10–25, 2014. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.002>.

BUSSEY, C.E., S.B. WITHERS, R.G. ALDOUS, *ET AL*. Obesity-related perivascular adipose tissue damage is reversed by sustained weight loss in the rat. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36: 1377–1385, 2016.<sup>[SEP]</sup>

BUTTERFIELD, D. A.; POON, H. F. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 40, 774–783, 2005.

BYCHKOV R, PIEPER K, RIED C, MILOSHEVA M, BYCHKOV E, LUFT FC, HALLER H. Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. *Circulation*. 6;99(13):1719-25, 1999.

CANTÓ C, GERHART-HINES Z, FEIGE JN, LAGOUGE M, NORIEGA L, MILNE JC, ELLIOTT PJ, PUIGSERVER P, AUWERX J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 458:1056–1060, 2009. <http://doi:10.1038/nature07813>

CAPETTINI, L.S., S.F. CORTES, J.F. SILVA, *ET AL*. Decreased production of neuronal NOS-derived hydrogen peroxide contributes to endothelial dysfunction in

atherosclerosis. *Br. J. Pharmacol.* 164:1738–1748, 2011.

CARLING D; ZAMMIT VA; HARDIE DG. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223: 217–222, 1987.

CASTEL, H. and VAUDRY, H. Nitric oxide directly activates GABA(A) receptor function through a cGMP/protein kinase-independent pathway in frog pituitary melanotrophs. *J Neuroendocrinol.* 13(8):695-705, Aug 2001.

CDC, NCHS. Cardiovascular Event Rates High in Middle Age: CDC Medscape - Sep 11, 2018.

CDC, NCHS. Underlying Cause of Death 1999-2013 on [CDC WONDER Online Database](#), released 2015. Data are from the Multiple Cause of Death Files, 1999-2013, as compiled from data provided by the 57 vital statistics jurisdictions through the Vital Statistics Cooperative Program. Accessed Feb. 3, 2015.

CELERMAJER DS, SORENSEN KE, SPIEGELHALTER DJ, GEORGAKOPOULOS D, ROBINSON J, DEANFIELD JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 24:471– 6,1994.

CELERMAJER DS, SORENSEN KE, SPIEGELHALTER DJ, GEORGAKOPOULOS D, ROBINSON J, DEANFIELD JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:471–476.

CERNADAS MR, SÁNCHEZ DE MIGUEL L, GARCÍA-DURÁN M, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ F, MILLÁS I, MONTÓN M, RODRIGO J, RICO L, FERNÁNDEZ P, DE FRUTOS T, RODRÍGUEZ-FEO JA, GUERRA J, CAMELO C, CASADO S, LÓPEZ-FARRÉ. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. [Circ Res.](#) 10 ; 83(3):279-86, 1998.

CHANG L, VILLACORTA L, LI R, HAMBLIN M, XU W, DOU C, ZHANG J, WU J, ZENG R, CHEN YE. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation.* 28;126(9):1067-78, 2012. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104489. Epub 2012 Aug 1.

CHEN ZP, MITCHELHILL KI, MICHELL BJ, STAPLETON D, RODRIGUEZ-CRESPO I, WITTERS LA, POWER DA, ORTIZ DE MONTELLANO PR, KEMP BE. AMP activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Letters.* 1999; 443:285–289.10.1016/S0014-5793(98)01705-0 [PubMed:10025949].

CHOU, T.C., YEN, M.H., LI, C.Y. & DING, Y.A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension,* 31, 643–648,1998.

CINTI, S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med,* 43, 104-115, 2011.

COLAÇO A.L., TOSTES R.C.A., FORTES Z.B., CARVALHO M.H.C. *Biologia vascular e endotélio*. In: CHAGAS, A. C. P., LAURINDO, F. R. M., LIBBY, P., LUZ, P. L. *Endotélio e Doenças Cardiovasculares*. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

CORRELL, J.W. Adipose tissue: ability to respond to nerve stimulation in vitro. *Science*, Vol. 140, Issue 3565, pp. 387-38826, 1963.

CORRIU, C.; FELETOU, M.; CANET, E.; VANHOUTTE, P.M. Inhibitors of the cytochrome P450-mono-oxygenase and endothelium dependent hyperpolarizations in the guinea-pig isolated carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, 117, 607 ± 610, 1996a.

CORRIU, C.; FELETOU, M.; CANET, E.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 119, 959 ± 964, 1996b.

COSTA G; GARABITO M; JIMÉNEZ-ALTAYÓ F; ONETTI Y; M SABATE, VILA E; DANTAS AP. Sex differences in angiotensin II responses contribute to a differential regulation of cox-mediated vascular dysfunction during aging. *Experimental Gerontology* 85, 71-80, 2016.

CRANE BR, ARVAI AS, GHOSH DK, WU C, GETZOFF ED, STUEHR DJ, TAINER JA. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*. 279:2121–2126, 1998.

CSISZAR, A.; UNGVARI, Z.; EDWARDS, J.G.; KAMINSKI, P.; WOLIN, M.S.; KOLLER, A.; KALEY, G. Aging induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ. Res.*, 90, 1159–1166, 2002.

DA COSTA JP, VITORINO R, SILVA GM, VOGEL C, DUARTE AC, ROCHA-SANTOS T. A synopsis on aging - Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev.* 29:90–112, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>.

DA COSTA RM, DA SILVA JF, ALVES JV, DIAS TB, RASSI DM, GARCIA LV2, LOBATO NS, TOSTES RC. Increased O-GlcNAcylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Compromises the Anti-contractile Properties of Perivascular Adipose Tissue in Metabolic Syndrome. *Front Physiol.* 6;9:341, 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.00341. eCollection 2018.

DA COSTA, R.M., FAIS, R. S., DECHANDT, C. R. P., LOUZADA-JUNIOR, P., ALBERICI, L. C., LOBATO, N. S., AND TOSTES, R. C. Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular adipose tissue in high-fat diet obese mice. *British Journal of Pharmacology*, 174: 3527–3541, 2017. doi: [10.1111/bph.13687](https://doi.org/10.1111/bph.13687).

DANTAS AP, TOSTES RC, FORTES ZB, COSTA SG, NIGRO D, CARVALHO MH. In Vivo Evidence for Antioxidant Potential of Estrogen in Microvessels of Female Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 39:405-411, 2002. <https://doi.org/10.1161/hy0202.102993>.

DANTAS, AP.; ONETTI, Y.; OLIVEIRA, MA.; CARVALHO, M. H.; HERAS, M.; VILA, E.; JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F. Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent ones. *Exp Gerontol.*, 55:1-11, 2014.

DASHWOOD MR, DOOLEY A, SHI-WEN X, ABRAHAM DJ, SOUZA DS. Does periadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery?. *J Vasc Res.* 44(3):175-81, 2007. Epub 2007 Feb 16.

DAVEL AP, KAWAMOTO EM, SCAVONE C, VASSALLO DV, ROSSONI LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *Br J Pharmacol* 148: 629–639, 2006.

DAVIES PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 75(3):519-60, 1995.

DE MEY JG, CLAEYS M, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 222:166–173,1982.

DELP, M. D., BEHNKE, B. J., SPIER, S. A., WU, G., & MULLER-DELP, J. M. Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. *The Journal of Physiology*, 586 (Pt 4), 1161–1168, 2008. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147686>.

DENG G, LONG Y, YU YR, LI MR. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS pathway. *Int J Obes (Lond)* 34: 165–171, 2010.

DIMMELER S, FLEMING I, FISSLTHALER B, HERMANN C, BUSSE R, ZEIHNER AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 10;399(6736):601-5, 1999.

DING H, KUBE P, TRIGGLE C. Potassium and acetylcholine-induced vasorelaxation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 129: 1194–1200, 2000.

DONATO AJ, HENSON GD, HART CR, LAYEC G, TRINITY JD, BRAMWELL RC, ENZ RA, MORGAN RG, REIHL KD, HAZRA S, WALKER AE, RICHARDSON RS, LESNIEWSKI LA. The impact of ageing on adipose structure, function and vasculature in the B6D2F1 mouse: evidence of significant multisystem dysfunction. *The Journal of Physiology*, 592(Pt 18), 4083–4096, 2014. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.274175>.

DUBROVSKA G, VERLOHREN S, LUFT FC, GOLLASCH M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(3):H1107-13, 2004. DOI:[10.1152/ajpheart.00656.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00656.2003).

EL ASSAR, M.; ANGULO, J.; VALLEJO, S.; PEIRÓ, C.; SÁNCHEZ-FERRER, C.;

RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Mechanisms involved in the aging-induced vascular dysfunction. *Frontiers in Physiology*, v. 3, Article 132:1, 2012.

ERUSALIMSKY, J. D. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *Journal of Applied Physiology* 1985, v. 106, n. 1, p. 326-32, 2009.

ERUSALIMSKY, J. D.; SKENE, C. Mechanisms of endothelial senescence. *Experimental Physiology*, v. 94, n. 3, p. 299-304, 2009.

FANG L, ZHAO J, CHEN Y, MA T, XU G, TANG C, LIU X, GENG B. Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens* 27: 1034–1049, 2009.

FELETOU, M. and VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Where Are We Now?. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26:1215-1225, 2006. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000217611.81085.c5>.

FERRARI, A.U., RADAELLI, A., CENTOLA, M. Invited review: aging and the cardiovascular system. *J. Appl. Physiol.* 95, 2591–2597, 2003.

FÉSÜS G, DUBROVSKA G, GORZELNIAK K, KLUGE R, HUANG Y, LUFT FC, GOLLASCH M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res* 75:719–727, 2007.

FITZGIBBONS TP, KOGAN S, AOUADI M, HENDRICKS GM, STRAUBHAAR J, CZECH MP. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301:H1425–H1437, 2011.

FLEMING I, BUSSE R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284:R1–R12, 2003.

FLEMING I, FISSALTHALER B, HERMANN C, BUSSE R, ZEIHNER AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605, 1999.

FLOOD, J. F.; FARR, S. A.; KAISER, F. E. AND MORLEY, J. E. Age-Related Impairment in Learning but not Memory in SAMP8 Female Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 50, No. 4, pp. 661-664, 1995.

FOLKOW B and SVANBORG A. Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev.* 73(4):725-64, 1993.

FORMAN, K.; VARA, E.; GARCIA, C.; KIREEV, R.; CUESTA, S.; ESCAMES, G.; TRESGUERRES, J.A. Effect of a combined treatment with growth hormone and melatonin in the cardiogeriatric aging on male SAMP8 mice. *The journals of gerontology. Series A.*, v. 66A, Issue 8, p. 823–834, 2011.

FÖSTERMANN U. and W. C. Sessa. Nitric oxide synthases: regulation and function.



European Heart Journal 33, 829–837, 2012. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.

FÖSTERMANN U., CLOSS EL., POLLOCK JS, NAKANE M., SCHWARZ P., GATH I., KLEINERT H. Nitric oxide isoenzymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*, 23: 1121-1131,1994.

FRAGA, M.F.; ESTELLER, M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends in Genetics*, v. 23, issue 8, p.413–418, 2007.

FRONTINI, A and CINTI, S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*, 11, 253-256, 2010.

FULTON D, GRATTON JP, MCCABE TJ, FONTANA J, FUJIO Y, WALSH K, FRANKE TF, PAPAPETROPOULOS A, SESSA WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 399:597–601, 1999. 10.1038/21218 [PubMed: 10376602]

FUMAGALLI M, ROSSIELLO F, CLERICI M, BAROZZI S, CITTARO D, KAPLUNOV JM, BUCCI G, DOBREVA M, MATTI V, BEAUSEJOUR CM, HERBIG U, LONGHESE MP, D'ADDA DI FAGAGNA F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nature Cell Biology*,14(4), p.355– 365, 2012.

FURCHGOTT RF, JOTHIANANDAN D. Endothelium-dependent and –independent vasodilatation involves cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*. 28:52– 61, 1991.

FURCHGOTT RF, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989; 3: 2007–2017.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.

GAETANI, G.F.; GALIANO, S.; CANEPA, L.; FERRARIS, A.M.; KIRKMAN, H.N. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, v.73, p. 334-339, 1989.

GALLIS B, CORTHALS GL, GOODLETT DR, UEBA H, KIM F, PRESNELL SR, FIGEYS D, HARRISON DG, BERK BC, AEBERSOLD R, CORSON MA. Identification of flow dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Journal of Biological Chemistry*. 274:30101–30108, 1999.10.1074/jbc.274.42. 30101 [PubMed: 10514497].

GALVEZ-PRIETO B, BOLBRINKER J, STUCCHI P, DE LAS HERAS AI, MERINO B, ARRIBAS S, RUIZ-GAYO M, HUBER M, WEHLAND M, KREUTZ R, FERNANDEZ-ALFONSO MS. *J Endocrinol*. 197(1):55–64, 2008.


GAO YJ, HIROTA S, ZHANG DW, JANSSEN LJ, LEE RM. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*.138(6):1085-92, 2003.

GAO YJ, HOLLOWAY AC, ZENG ZH, LIM GE, PETRIK JJ, FOSTER WG, LEE RM. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obes Res* 13:687–692, 2005.

GAO YJ, ZENG ZH, TEOH K, SHARMA AM, ABOUZAHR L, CYBULSKY I, LAMY A, SEMELHAGO L, LEE RM. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 130:1130-6, 2005.

GAO YJ, ZENG ZH, TEOH K, SHARMA AM, ABOUZAHR L, CYBULSKY I, LAMY A, SEMELHAGO L, LEE RM. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130: 1130–1136, 2005.

GAO, D., ZUO, Z., TIAN, J., ALI, Q., LIN, Y., LEI, H., SUN, Z. Activation of SIRT1 Attenuates Klotho Deficiency-induced Arterial Stiffness and Hypertension by Enhancing AMPK $\alpha$  Activity. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 68(5), 1191–1199, 2016. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07709>

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.* 13, 2185–2192, 2007. 

GAO, Y. J.; LU, C.; SU, L.Y.; SHARMA, A. M.; LEE, R. M. K. W. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol*, v. 151, n. 3, p. 323-331, 2007.

GARLAND CJ, PLANE F. Relative importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor for the relaxation of vascular smooth muscle in different arterial beds. In: Vanhoutte PM ed. *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*, Amsterdam: Harwood Academic Publishers 173–179, 1996.

GERHARD M, RODDY MA, CREAGER SJ, CREAGER MA. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension* 27(4):849-53, 1996.

GIL-ORTEGA M, CONDEZO-HOYOS L, GARCÍA-PRIETO CF, ARRIBAS SM, GONZÁLEZ MC, ARANGUEZ I, RUIZ-GAYO M, SOMOZA B, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One*. 23;9(4):e95312, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0095312. eCollection 2014.

GIL-ORTEGA M, CONDEZO-HOYOS L, GARCÍA-PRIETO CF, ARRIBAS SM, GONZÁLEZ MC, ARANGUEZ I, RUIZ-GAYO M, SOMOZA B, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS. Adaptive nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. *Endocrinology* 151: 3299–3306, 2010.

GIL-ORTEGA M, SOMOZA B, HUANG Y, GOLLASCH M, FERNANDEZ- ALFONSO MS. Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 26: 367-375, 2015. DOI: 10.1016/j.tem.2015.04.003.

GODO, S. and HIROAKI, S. Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37: e108-e114, 2017. [Http://DOI:10.1161/ATVBAHA.117.309813](http://DOI:10.1161/ATVBAHA.117.309813).

GOIRAND F, SOLAR M, ATHEA Y, VIOLLET B, MATEO P, FORTIN D, LECLERC J, HOERTER J, VENTURA-CLAPIER R, GARNIER A. Activation of AMP kinase alpha1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *J Physiol* 581:1163–1171, 2007. <http://doi:10.1113/jphysiol.2007.132589>.

GOLLASCH M, DUBROVSKA G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 647–653, 2004.

GREENSTEIN AS, KHAVANDI K, WITHERS SB, SONOYAMA K, CLANCY O, JEZIORSKA M, LAING I, YATES AP, PEMBERTON PW, MALIK RA, HEAGERTY AM. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation* 119:1661-70, 2009.

GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; RIFKIND, B.M.; KULLER, L.H. Cholesterol lowering in the elderly population: Coordinating Committee of the National Cholesterol Education Program. *Arch Intern Med.*, v. 159, p. 1670 –1678, 1999.

GRYGLEWSKI R. J., R. M. J. PALMER MONCADA, S.. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* volume 320, pages454–456, 1986.

HAMILTON, C. A.; BROSNAN, M. J.; MCINTYRE, M.; GRAHAM, D.; DOMINICZAK, A. F. Superoxide Excess in Hypertension and Aging. *Hypertension* 37:529-534, 2001. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.37.2.529>.

HAN, S. and BRUNET, A. Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends in Cell Biology*, v. 22, 42–49, 2012.

HARDIE DG and HAWLEY SA. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Bioessays*, 23:1112–1119, 2001. doi: 10.1002/bies.10009.

HARVEY, W. "Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus". Frankfurt: 1628 Sp Coll Hunterian Y.7.13.

HASHIMOTO, C.M. Tratamento crônico com losartana corrige a disfunção do tecido adiposo perivascular em camundongos obesos. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-19012017-145956/pt-br.php>>. Acesso em: 5/04/2018.

HAYABUCHI, Y., NAKAVA, Y., MATSUOKA, S., AND KURODA, Y. Hydrogen

peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Heart & Vessels* 13: 9-17, 1998.

HAYFLICK, L. and MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621, 1961.

HEUSCH G. Adrenergic mechanisms in myocardial ischemia. *Circulation* 81: 1–13, 1991.

HIBBS JB JR, TAINTOR RR, VAVRIN Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science.* 235:473–476, 1987.

HILDEBRAND S, STÜMER J, PFEIFER A. PVAT and Its Relation to Brown, Beige, and White Adipose Tissue in Development and Function. *Front Physiol.* 6:9:70, 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.00070. eCollection 2018.

HÖHN A, WEBER D, JUNG T, OTT C, HUGO M, KOCHLIK B, KEHM R, KÖNIG J, GRUNE T, CASTRO JP. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biology*, v. 11, p. 482–501, 2017.

HOIT, R.A. and WALSH, B.D. Normal physiology of the cardiovascular system. In: Walsh, R.; Fang, J.; Fuster, V. and O'Rourke, R. *HURST'S The Heart Manual of Cardiology*, Thirteenth Edition. US: McGraw-Hill Professional. cap. 5, p.94-116, 2012.

HOSOKAWA M, KASAI R, HIGUCHI K, TAKESHITA S, SHIMIZU K, HAMAMOTO H, HONMA A, IRINO M, TODA K, MATSUMURA A, *ET AL.* Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev.* 26(1):91-102, 1984.

HOU, X., XU, S., MAITLAND-TOOLAN, K. A., SATO, K., JIANG, B., IDO, Y., ... ZANG, M. SIRT1 Regulates Hepatocyte Lipid Metabolism through Activating AMP-activated Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20015–20026, 2008. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802187200>.

HUANG A, SUN D, CARROLL MA, JIANG H, SMITH CJ, CONNETTA JA, FALCK J, SHESEL EG, KOLLER A, KALEY G. EDHF mediates flow-induced dilation in skeletal muscle arterioles of female eNOS-KO mice. *Am J Physiol.* 280: H2462–H2469, 2001.

HUANG F., LEZAMA M.A.R., ONTIVEROS J.A.P., BRAVO G., VILLAFAÑA S., DEL-RIO-NAVARRO B.E., HONG E. Effect of Losartan on Vascular Function in Fructose-Fed Rats: The Role of Perivascular Adipose Tissue. *Clinical and Experimental Hypertension* 32: 98-104, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Acesso em 18 de junho de 2017.

IGNARRO L. J., BYRNS R. E., WOOD K. S. Endothelium Dependent Modulation of cGMP Levels and Intrinsic Smooth Muscle Tone in Isolated Bovine Intrapulmonary Artery and Vein. *Circulation Research* 60:82-92, 1987.

IWASHIMA Y, KATSUYA T, ISHIKAWA K, OUCHI N, OHISHI M, SUGIMOTO K, FU Y, MOTONE M, YAMAMOTO K, MATSUO A, OHASHI K, KIHARA S, FUNAHASHI T, RAKUGI H, MATSUZAWA Y, OGIHARA T. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension* 43:1318–23, 2004.

JIANKANG LIU and AKITANE MORI. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mechanisms of Ageing and Development* 71 23-30, 1993.

JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F.; ONETTI, Y.; HERAS, M.; DANTAS, AP.; VILA, E. Western-style diet modulates contractile responses to phenylephrine differently in mesenteric arteries from senescence-accelerated prone (SAMP8) and resistant (SAMR1) mice. *AGE*, 35:1219–1234, 2013.

KARUPPAGOUNDER V, ARUMUGAM S, BABU SS, PALANIYANDI SS, WATANABE K, COOKE JP, THANDAVARAYAN RA. The senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8): A novel murine model for cardiac aging. *Ageing Res Rev.* 35:291-296, 2017. doi: 10.1016/j.arr.2016.10.006. Epub 2016 Nov 5.

KIRKWOOD, T.B. Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437–447, 2005.

KONG LR, ZHOU YP, CHEN DR, RUAN CC, GAO PJ. Decrease of Perivascular Adipose Tissue Browning Is Associated With Vascular Dysfunction in Spontaneous Hypertensive Rats During Aging. *Front Physiol.* 18;9:400, 2018. doi: 10.3389/fphys.2018.00400. eCollection 2018.

KOTSIS, V., STABOULI, S., KARAFILLIS, I., AND NILSSON, P. Early vascular aging and the role of central blood pressure. *J. Hypertens.* 29, 1847–1853, 2011.

KOUBOVA J and GUARENTE L. How does calorie restriction work?. *Genes Dev.* 1;17(3):313-21, 2003. DOI: 10.1101/gad.1052903

KOVACIC, J.C.; MORENO, P.; HACHINSKI, V.; NABEL, E.G.; FUSTER V. Cellular Senescence, Vascular Disease, and Aging. *Circulation*, 123:1650-1660, 2011.

KRIEF, S.; LONNQVIST, F.; RAIMBAULT, S.;BAUDE, B.; VAN SPRONSEN A.; ARNER, P.; STROSBERG, A.D.; RICQUIER, D. AND EMORINE, LJ. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 91, 344–349, 1993.

KRIEGER, J E, ed. Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares: a interação entre a pesquisa e a prática clínica. Capítulo 25, pág. 331-386. São Paulo: Atheneu, 2008.

KÜNG C. F. AND LÜSCHER T. F.. Different Mechanisms of Endothelial Dysfunction

With Aging and Hypertension in Rat Aorta. *Hypertension* 25:194–200, 1995. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.25.2.194>.

KUROKAWA T1, ASADA S, NISHITANI S, HAZEKI O. Age-related changes in manganese superoxide dismutase activity in the cerebral cortex of senescence-accelerated prone and resistant mouse. *Neurosci Lett*. 2001 Feb 2;298(2):135-8.

LACZA Z, PUSKAR M, KIS B, PERCIACCANTE JV, MILLER AW, BUSIJA DW. Hydrogen peroxide acts as an EDHF in the piglet pial vasculature in response to bradykinin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul;283(1):H406-11, 2002.

LAKATTA EG and LEVY D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation* 107:139-146, 2003. doi: 10.1161/01.CIR.0000048892.

LAKATTA EG, WANG M, NAJJAR SS. Arterial aging and subclinical arterial disease are fundamentally intertwined at macroscopic and molecular levels. *Med Clin North Am*. 93:583–604, 2009.

LAKATTA EG. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol Rev*.;73:413–465, 1993.

LASSÈGUE, B., SAN MARTÍN, A., GRIENDLING, K. K. Biochemistry, Physiology and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 110(10), 1364–1390, 2012. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243972>.

LAUFS U, GERTZ K, DIRNAGL U, BOHM M, NICKENIG G, ENDRES M. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res* 942: 23–30, 2002.

LAUFS U, GERTZ K, HUANG P, NICKENIG G, BOHM M, DIRNAGL U *ET AL*. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31: 2442–2449, 2000.

LEBRÃO, ML. O envelhecimento no Brasil: aspectos da transição demográfica e epidemiológica. *Saúde Coletiva*, 4: 135-140, 2007.

LEE R. M., LU C., SU L. Y., GAO Y. J. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J. Hypertens*. 27, 782–790, 2009. Doi: 10.1097/HJH.0b013e328324ed86.

LEE, Y. C., CHANG, H. H., CHIANG, C. L., LIU, C. H., YEH, J. I., CHEN, M. F., *ET AL*. Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. *Circulation* 124, 1160–1171, 2011. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.027375

LEES H, WALTERS H, COX LS. Animal and human models to understand ageing. *Maturitas* 93:18–27, 2016;. Doi: 10.1016/j.maturitas.2016.06.008.

LEPRÊTRE, N., MIRONNEAU, J. AND MOREL, J-L. Both  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenoceptor subtypes stimulate voltage-operated L-type calcium channels in rat portal vein myocytes. *J. Biol. Chem.*, 269: 29546-29552, 1994.

LI, H and FÖRSTERMANN, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol*, 13: 161–167, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.01.006>.

LLORENS S, DE MERA RM, PASCUAL A, PRIETO-MARTÍN A, MENDIZÁBAL Y, DE CABO C, NAVA E, JORDÁN J. The senescence-accelerated mouse (SAM-P8) as a model for the study of vascular functional alterations during aging. *Biogerontology*. 8(6):663-72, 2007. Epub 2007 Sep 5.

LLORENS S, DE MERA RM, PASCUAL A, PRIETO-MARTÍN A, MENDIZÁBAL Y, DE CABO C, NAVA E, JORDÁN J. The senescence-accelerated mouse (SAM-P8) as a model for the study of vascular functional alterations during aging. *Biogerontology* 8(6):663-72, 2007. Epub 2007 Sep 5.

LÖHN, M.; DUBROVSKA, G.; LAUTERBACH, B.; LUFT, F. C.; GOLLASCH, M.; SHARMA, A. M. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *Faseb J*, 16: 1057–1063, 2002.

LÓPEZ-OTÍN, C., BLASCO, M. A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M., & KROEMER, G. The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.

LU C, SU LY, LEE RM AND GAO YJ. Alterations in perivascular adipose tissue structure and function in hypertension. *Eur J Pharmacol* 656, 68–73, 2011.

LU C, SU LY, LEE RM, GAO YJ. Mechanisms for perivascular adipose tissue-mediated potentiation of vascular contraction to perivascular neuronal stimulation: the role of adipocyte-derived angiotensin II. *Eur J Pharmacol*. 25;634(1-3):107-12, 2010. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.02.006.

LYNCH FM, WITHERS SB, YAO Z, WERNER ME, EDWARDS G, WESTON AH, HEAGERTY AM. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activated BKCa channels to induce anticontractile responses. *American Journal of Physiology*, 2013.

MAJITHIYA JB, BALARAMAN R. Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 78: 2615–2624, 2006.

MALINOWSKI M, DEJA MA, GOŁBA KS, ROLEDER T, BIERNAT J, WOŚ S. Perivascular tissue of internal thoracic artery releases potent nitric oxide and prostacyclin-independent anticontractile factor. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Feb;33(2):225-31. Epub 2007 Dec 20.

MARCHESI C, EBRAHIMIAN T, ANGULO O, PARADIS P, SCHIFFRIN EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension* 54:1384–1392, 2009.

MARGARITIS M, ANTONOPOULOS AS, DIGBY J, LEE R, REILLY S, COUTINHO P, SHIRODARIA C, SAYEED R, PETROU M, DE SILVA R, JALILZADEH S, DEMOSTHENOUS M, BAKOGIANNIS C, TOUSOULIS D, STEFANADIS C, CHOUDHURY RP, CASADEI B, CHANNON KM, ANTONIADES C. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation*, v. 127, p. 2209–2221, 2013.

MATOBA T, SHIMOKAWA H, NAKASHIMA M, HIRAKAWA Y, MUKAI Y, HIRANO K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 106: 1521-1530, 2000.

MATOBA T, SHIMOKAWA H, NAKASHIMA M, HIRAKAWA Y, MUKAI Y, HIRANO K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 209- 213, 2002.

MATSUZAWA Y. Therapy insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 3:35–42, 2006.

MATZ, R.L., SCHOTT, C., STOCLET, J.C., ANDRIANTSITOHAINA, R. Age-related endothelial dysfunction with respect to NO, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol. Res*. 49, 11–18, 2000.

MATZ, RL; ANDRIANTSITOHAINA, R. Age-related endothelial dysfunction: potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging*. 20(7):527-50, 2003.

MCCABE TJ, FULTON D, ROMAN LJ, SESSA WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain ‘calcium-independent’ eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem*. 275:6123–6128, 2000.

MCCORD, J.M. AND FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J.Biol.Chem.*, v.244, p. 6049-6055, 1969.

MEIJER RI, BAKKER W, ALTA CL, SIPKEMA P, YUDKIN JS, VIOLLET B, RICHTER EA, SMULDERS YM, VAN HINSBERGH VW, SERNÉ EH, ERINGA EC. Perivascular adipose tissue control of insulin-induced vasoreactivity in muscle is impaired in db/db mice. *Diabetes* 62: 590–598, 2013.

MIAO, C-Y. and LI, Z-Y. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *British Journal of Pharmacology*, 165(3):643-658, 2012.

MICHELINI, L.C. e ROSSONI, L.V. Vasomotricidade e Regulação local de fluxo. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 32, p.497-513.



MICHELL BJ, CHEN Z, TIGANIS T, STAPLETON D, KATSIS F, POWER DA, SIM AT, KEMP BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 276:17625–17628, 2001.10.1074/jbc.C100122200 [PubMed: 11292821].

Ministério da Saúde - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM), 2016b. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 18 de junho de 2017.

Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), 2016a. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/sistemas-e-aplicativos/hospitalares/sihsus>>. Acesso em 18 de junho de 2017.

MIYAMOTO M, KIYOTA Y, YAMAZAKI N, NAGAOKA A, MATSUO T, NAGAWA Y, TAKEDA T. Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiol Behav* 38:399–406, 1986. [http://doi:10.1016/0031-9384\(86\)90112-5](http://doi:10.1016/0031-9384(86)90112-5).

MONCADA S. and VANE JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 30:293–331, 1979.

MORLEY JE, FARR SA, FLOOD JF. Antibody to amyloid beta protein alleviates impaired acquisition retention, and memory processing in SAMP8 mice, *Neurobiol. Learn. Mem.* 78 125–138, 2002.

MORROW VA, FOUFELLE F, CONNELL JM, PETRIE JR, GOULD GW, SALT IP. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 278:31629–31639, 2003. doi: 10.1074/jbc.M212831200.

MUSTAFA AK, GADALLA MM, SNYDER SH. Signaling by gasotransmitters. *Sci Signal* 2:re2, 2009.

NAHMIAS C, BLIN N, ELALOUF JM, MATTEI MG, STROSBERG AD AND EMORINE LJ. Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J* 10, 3721–3727, 1991.

NICHOLS, W.W. McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles. 6th edition. London, England: Hodder Arnold, 2011.

NOVELLA S, DANTAS AP, SEGARRA G, NOVENSÀ L, BUENO C, HERAS M, HERMENEGILDO C, MEDINA P. Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Exp. Gerontol.*, Volume 45, Issue 11, p. 868-874, 2010.

NOVELLA S, DANTAS AP, SEGARRA G, NOVENSÀ L, HERAS M,

HERMENEGILDO C, MEDINA P. Aging enhances contraction to thromboxane A2 in aorta from female senescence-accelerated mice. *Age (Dordr)*. 35(1):117-28, 2013a. doi: 10.1007/s11357-011-9337-y. Epub 2011 Nov 19.

NOVELLA S, DANTAS AP, SEGARRA G, VIDAL-GÓMEZ X, MOMPEÓN A, GARABITO M, HERMENEGILDO C, MEDINA P. Aging-related endothelial dysfunction in the aorta from female senescence-accelerated mice is associated with decreased nitric oxide synthase expression. *Exp. Gerontol.*, 48, 1329–1337, 2013b.

O'TOOLE TE, CONKLIN DJ, BHATNAGAR A. Environmental risk factors for heart disease. *Rev Environ Health* 23: 167–202, 2008.

OKAMOTO Y, KIHARA S, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, LIBBY P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*;110:267–78, 2006

ONETTI, Y.; JIMÉNEZ-ALTAYÓ, F.; HERAS, M.; VILA, E., DANTAS, AP. Western-type diet induces senescence, modifies vascular function in non- senescence mice and triggers adaptive mechanisms in senescent ones. *Experimental Gerontology*, 48, 1410–1419, 2013.

ONG KL, TSO AW, LAM KS, CHEUNG BM. Gender Difference in Blood Pressure Control and Cardiovascular Risk Factors in Americans With Diagnosed Hypertension. *Hypertension*. 51:1142-1148, 2008. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.105205>.

Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Doenças cardiovasculares: Principais Fatos. Revisado em maio de 2017. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096). Acesso em 03 março 2019.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.*, v.11, p. 85– 97. doi:10.1038/nri2921. 2011.

OZEN G, TOPAL G, GOMEZ I, ET AL. Control of human vascular tone by prostanoids derived from perivascular adipose tissue. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 107:13-7, 2013.

PADILLA, J., JENKINS, N. T., VIEIRA-POTTER, V. J., LAUGHLIN, M. H. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(7), R543–R552, 2013. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00567.2012>.

PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 11-17;327(6122):524-6, 1987.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333:664–666, 1988.

PAYNE G. A., BORBOUSE L., KUMAR S., NEEB Z., ALLOOSH M., STUREK M., TUNE J. D. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-beta pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1711–1717, 2010. 101161/ATVBAHA.110.210070.

RADI R, BECKMAN JS, BUSH KM, FREEMAN BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1;288(2):481-7, 1991.

RAPOPORT, R M and MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circulation Research.* 52:352-357, 1983. <https://doi.org/10.1161/01.RES.52.3.352>.

REED AL, TANAKA A, SORESCU D, LIU H, JEONG EM, STURDY M, WALP ER, DUDLEY SC JR, SUTLIFF RL. Diastolic dysfunction is associated with cardiac fibrosis in the senescence-accelerated mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301(3):H824-31, 2011. doi: 10.1152/ajpheart.00407.2010. Epub 2011 Jul 1.

REES DD, PALMER RMJ, MONCADA S. The role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;86:3375–3378, 1989b.

RODRÍGUEZ-MAÑAS L, EL-ASSAR M, VALLEJO S, LOPEZ-DORIGA P, SOLIS J, PETIDIER R, *ET AL.* Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell,* 8: 226-238, 2009.

ROMERO-CALVO I, OCÓN B, MARTÍNEZ-MOYA P, SUÁREZ MD, ZARZUELO A, MARTÍNEZ-AUGUSTIN 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. doi: 10.1016/j.ab.2010.02.036. Epub 2010 Mar 3.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. What we talk about when we talk about fat. *Cell.*, v.156, p. 20–44, 2014.

ROTHWELL PM, COULL AJ, SILVER LE, FAIRHEAD JF, GILES MF, LOVELOCK CE, REDGRAVE JN, BULL LM, WELCH SJ, CUTHBERTSON FC, BINNEY LE, GUTNIKOV SA, ANSLOW P, BANNING AP, MANT D, MEHTA Z; Oxford Vascular Study. Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet,* 366:1773–83, 2005.

RUBANYI GM, LORENZ RR, VANHOUTTE PM. Bioassay of endothelium derived relaxing factor(s). Inactivation by catecholamines. *Am J Physiol.* 249:H95–H101, 1985.

RUBANYI, G.M., VANHOUTTE, P.M., 1986. Superoxide anions and hyperoxia

inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 250, H822–H827.

SALMINEN A, KAARNIRANTA K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev.* 11(2):230-41, 2012. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2011.12.005>.

SALT, I. P., and HARDIE, D. G. AMP-Activated Protein Kinase – A Ubiquitous Signalling Pathway with Key Roles in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 120(11), 1825–1841, 2017. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309633>.

SATO E, ODA N, OZAKI N, HASHIMOTO S, KUROKAWA T, ISHIBASHI S. Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev* 86:105–114, 1996.

SAXTON SN, RYDING KE, ALDOUS RG, WITHERS SB, OHANIAN J, HEAGERTY AM. Role of Sympathetic Nerves and Adipocyte Catecholamine Uptake in the Vasorelaxant Function of Perivascular Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38(4):880-891, 2018. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310777.

SCHLEIFENBAUM J, KÖHN C, VOBLOVA N, DUBROVSKA G, ZAVARIRSKAYA O, GLOE T, CREAN CS, LUFT FC, HUANG Y, SCHUBERT R, GOLLASCH M. Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J Hypertens.* 28(9):1875-82, 2010. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833c20d5.

SCHRAMMEL A, MUSSBACHER M, WÖLKART G, STESEL H, PAIL K, WINKLER S, SCHWEIGER M, HAEMMERLE G, AL ZOUGHBI W, HÖFLER G, LAMETSCHWANDTNER A, ZECHNER R, MAYER B. Endothelial dysfunction in adipose triglyceride lipase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1841:906-17, 2014.

SCHUTZER, W. E.; MADER, S. L. Age-related changes in vascular adrenergic signaling: clinical and mechanistic implications. *Ageing Research Reviews*, v. 2, p. 169–190, 2003.

SCHWARZ, P.M., H. KLEINERT, U. FORSTERMANN. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 2584–2590, 1999.

SEDDON, M., N. MELIKIAN, R. DWORAKOWSKI, *ET AL.* 2009. Effects of neuronal nitric oxide synthase on human coronary artery diameter and blood flow in vivo. *Circulation* 119: 2656–2662.

SEMSEI I, RAO G, RICHARDSON A. Expression of superoxide dismutase and catalase in rat brain as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1;58(1):13-9, 1991.

SHENG, L-J; RUAN, C-C; MA, Y.; CHEN, D-R; KONG, L-R; ZHU, D-L; GAO, P-J. Beta3 adrenergic receptor is involved in vascular injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive mice. *FEBS, Federation of European Biochemical Societies Letters* 590, 769–778, 2016.

SHENTU, T.-P., HE, M., SUN, X., ZHANG, J., ZHANG, F., GONGOL, B., ... SHYY, J. Y.-J. AMPK and SIRT1 Coregulation of Cortactin Contributes to Endothelial Function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(12), 2358–2368, 2016. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307871>.

SIDMAN, R.L.; PERKINS, M.; WEINER, N. Noradrenaline and adrenaline content of adipose tissue. *Nature*, v.193, p.36-37, 1962.

SIRAGUSA, M. e FLEMING, I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 468: 1125, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1839-0>.

SOARES, C.M. Obesidade induz alterações artéria-específica: avaliação da função endotelial e do fenótipo das células musculares lisas. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-20022015-131713/pt-br.php>>. Acesso em: 5/04/2018.

SOHAL RS, KU HH, AGARWAL S, FORSTER MJ, LAL H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation, and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 1994;74:121–137.

SOHAL RS, MOCKETT RJ, ORR WC. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2002;33:575–586.

SOLTIS E. E.; CASSIS L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A.*, 13:277–296, 1991.

SUN Y, LI J, XIAO N, WANG M, KOU J, QI L, HUANG F, LIU B, LIU K. Pharmacological activation of AMPK ameliorates perivascular adipose/endothelial dysfunction in a manner interdependent on AMPK and SIRT1. *Pharmacol. Res.* 89: 19–28, 2014. <http://doi:10.1016/j.phrs.2014.07.006>.

SUN, D.; HUANG, A.; YAN, E. H.; WU, Z.; YAN, C.; KAMINSKI, P. M.; OURY, T. D.; WOLIN, M. S.; KALEY, G. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 286(6), H2249–H2256, june 2004. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00854.2003>.

SZABÓ, C. Gaseotransmitters: New frontiers for translational science. *Sci Transl Med* 2:59ps54, 2010.

SZABÓ, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6:917–935, 2007.

SZASZ, T. and WEBB, R. C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clinical Science* 122, 1–12, 2012 (Printed in Great Britain). <http://doi:10.1042/CS20110151>.

TADDEI, S., VIRDIS, A., MATTEI, P., GHIADONI, L., FASOLO, C. B., SUDANO, I., AND SALVETTI, A. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension* 29, 736–743, 1997.

TAKEDA, T.; HOSOKAWA, M.; TAKESHITA, S.; IRINO, M.; HIGUCHI, K.; MATSUSHITA, T.; TOMITA, Y.; YASUHIRA, K.; HAMAMOTO, H.; SHIMIZU, K.; ISHII, M.; YAMAMURO, T. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.*, 17, pp. 183- 194, 1981.

TALUKDER, M.A., T. FUJIKI, K. MORIKAWA, *ET AL.* Upregulated neuronal nitric oxide synthase compensates coronary flow response to bradykinin in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44: 437– 445, 2004.

TANG, E.H., LEUNG, F.P., HUANG, Y., FELETOU, M., SO, K.F., MAN, R.Y., VANHOUTTE, P.M. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *Br. J. Pharmacol.* 151, 15–23, 2007.

TANG, G.; YANG, G.; JIANG, B.; JU, Y.; WU, L.; WANG R. H<sub>2</sub>S Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 19, Number 14, 2013.

TANG, X., LUO, Y.-X., CHEN, H.-Z., & LIU, D.-P. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in Physiology*, 5, 175, 2014. <http://doi.org/10.3389/fphys.2014.00175>

TIRAPELLI CR, FUKADA SY, DE GODOY MA, DE OLIVEIRA AM. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of angiotensin II in the isolated rat carotid. *Life Sci* 78: 2676–2682, 2006.

TSUTSUI, M. Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J. Atheroscler. Thromb.* 11: 41–48, 2004.

UENO M, AKIGUCHI I, YAGI H, NAIKI H, FUJIBAYASHI Y, KIMURA J, TAKEDA T. Age-related changes in barrier function in mouse brain. I. Accelerated age-related increase of brain transfer of serum albumin in accelerated senescence prone SAM-P/8 mice with deficits in learning and memory. *Arch Gerontol Geriatr.* 16: 233–248, 1993.

UENO M, SAKAMOTO H, KANENISHI K, ONODERA M, AKIGUCHI I, HOSOKAWA M. Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiol Aging.* 22: 469–478, 2001.

United Nations, World Economic and Social Survey 2007: development in an ageing world. New York: United Nations Department of Social and Economic Affairs; 2007 ([http://www.un.org/en/development/desa/policy/wess/wess\\_archive/2007wess.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/policy/wess/wess_archive/2007wess.pdf), acesso em 20 de dezembro de 2018).

United Nations, World Population Prospects: 2015 Review. New York: United

Nations Department of Social and Economic Affairs; 2015 ([https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/Key\\_Findings\\_WPP\\_2015.pdf](https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/Key_Findings_WPP_2015.pdf)).

VAN DER LOO B, LABUGGER R, SKEPPER JN, *ET AL*. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192(12):1731-44.

VANHOUTTE P. M., BOCA R. *The Endothelium: Modulator of Cardiovascular Function*. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc;1–228, 1990.

VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. *Hypertension*. 2011 Mar;57(3):526-31.

VANHOUTTE, P. M. How We Learned to Say NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Aug;29(8):1156-60. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.190215.

VERAS, R. Fórum. Envelhecimento populacional e as informações de saúde do PNAD: demandas e desafios contemporâneos. Introdução. *Cad. Saúde Pública*, 23(10): 2463-6, 2007.

VERLOHREN S, DUBROVSKA G, TSANG SY, ESSIN K, LUFT FC, HUANG Y *ET AL*. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 44: 271–276, 2004.

VICTORIO JA, CLERICI SP, PALACIOS R, ALONSO MJ, VASSALLO DV, JAFFE IZ, ROSSONI LV, DAVEL AP. Spironolactone Prevents Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Vascular Dysfunction Induced by  $\beta$ -Adrenergic Overstimulation: Role of Perivascular Adipose Tissue. [Hypertension](#). 2016 Sep;68(3):726-35. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07911.

VIDAL-GÓMEZ, X.; NOVELLA, S.; PÉREZ-MONZÓ, I.; GARABITO, M.; DANTAS, AP.; SEGARRA, G.; HERMENEGILDO, C.; MEDINA, P. Decreased bioavailability of nitric oxide in aorta from ovariectomized senescent mice: Role of cyclooxygenase. *Experimental Gerontology*, v. 76, p. 1-8, 2016.

VIRMANI, R., AVOLIO, A. P., MERGNER, W. J., ROBINOWITZ, M., HERDERICK, E. E., CORNHILL, J. F., GUO, S. Y., LIU, T. H., OU, D. Y., ... O'ROURKE, M. Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *The American journal of pathology*, 139(5), 1119-29, 1991.

VLACHOPOULOS C, AZNAOURIDIS K, STEFANADIS C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 30;55(13):1318-27, 2010. doi: 10.1016/j.jacc.2009.10.061.

WALDÉN T.B., HANSEN I.R., TIMMONS J.A., CANNON B., NEDERGAARD J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, “brite,” and white adipose tissues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 302:E19–E31, 2012.

WANG S, XU J, SONG P, VIOLLET B, ZOU MH. In vivo activation of AMP- activated protein kinase attenuates diabetes-enhanced degradation of GTP cyclohydrolase I. *Diabetes*. 58:1893–1901, 2009. <http://doi:10.2337/db09-0267>.

WEI E.P., KONTOS H.A., BECKMAN J.S. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* 1996;271:H1262–H1266.

WELCH G and LOSCALZO J. Nitric oxide and the cardiovascular system. *J Card Surg.* 1994 May;9(3):361-71.

WESTERHOF N, LANKHAAR J-W, WESTERHOF BE. The arterial Windkessel. *Med Biol Eng Comput.* 47:131–41, 2008.

WESTON AH, EGNER I, PORTER EL, DONG Y, HEAGERTY AM, EDWARDS G. Stimulated release of a hyperpolarising factor (ADHF) from rat mesenteric artery perivascular adipose tissue; involvement of myocyte BK channels. *Br J Pharmacol* 169: 1500–1509, 2013.

WHITLOCK MC and HUNDLEY WG. Noninvasive Imaging of Flow and Vascular Function in Disease of the Aorta. *JACC Cardiovasc Imaging.* 8(9):1094-1106, 2015. doi: 10.1016/j.jcmg.2015.08.001.

WHO, Global health estimates 2013: deaths by cause, age, sex and regional grouping, 2000–2012. In: World Health Organization, Global health estimates [website]. Geneva: World Health Organization; 2015 ([http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en), accessed 24 July 2015).

WHO, World Health Organization. Health situation and trend assessment: Elderly population. 2012. Disponível em: <[http://www.searo.who.int/entity/health\\_situation\\_trends/data/chi/elderly-population/en/](http://www.searo.who.int/entity/health_situation_trends/data/chi/elderly-population/en/)>. Acesso em: 28 dez. 2018.

WILLIAMS G.C. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* Vol. 11, No. 4 (Dec., 1957), pp. 398-411. DOI: 10.2307/2406060.

World Health Organization (WHO), Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A/390) <[http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2\\_015\\_Report.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2_015_Report.pdf)>. Acesso em 18 de junho de 2017.

XIA, N., S. HORKE, A. HABERMEIER, *et al.* 2016. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in perivascular adipose tissue of diet-induced obese mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36: 78–85.

XIE Z, DONG Y, SCHOLZ R, NEUMANN D, ZOU MH. Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 117: 952–962, 2008.



XU J, LI N, DAI DZ, YU F, DAI Y. The endothelin receptor antagonist CPU0213 is more effective than aminoguanidine to attenuate isoproterenol induced vascular abnormality by suppressing overexpression of NADPH oxidase, ETA, ETB, and MMP9 in the vasculature. *J Cardiovasc Pharmacol* 52: 42–48, 2008.

YANAI, S. AND ENDO, S. Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Behavioural Brain Research* 308,187–195, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.04.026>

YANG, D., FELETOU, M., BOULANGER, C.M., WU, H.F., LEVENS, N., ZHANG, J.N., VANHOUTTE, P.M. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 136, 104–110, 2002.

ZABORSKA KE, WAREING M, AUSTIN C. Comparisons between perivascular adipose tissue and the endothelium in their modulation of vascular tone. *Br J Pharmacol.*,174(20):3388-3397, Oct. 2017. <http://doi:10.1111/bph.13648>.

ZHOU X and FROHLICH ED. Ageing, hypertension and the kidney: new data on an old problem. *Nephrol Dial Transplant* 18:1442–1445, 2003.

ZIEMAN SJ, GERSTENBLITH G, LAKATTA EG, ROSAS GO, VANDEGAER K, RICKER KM, HARE JM. Upregulation of the nitric oxide-cGMP pathway in aged myocardium: physiological response to l-arginine. *Circ Res.* 19;88(1):97-102, 2001.

ZOLTAN, U., SONNTAG, W. E., CSISZAR, A. Mitochondria and aging in the vascular system. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 88(10), 1021–1027, 2010. <http://doi.org/10.1007/s00109-010-0667-5>