

**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

## 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 anticonstrítil 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.

## 1. Introdução

### 1.1. Envelhecimento e as doenças cardiovasculares

*“Viver é envelhecer, nada mais.”*

(Simone de Beauvoir)

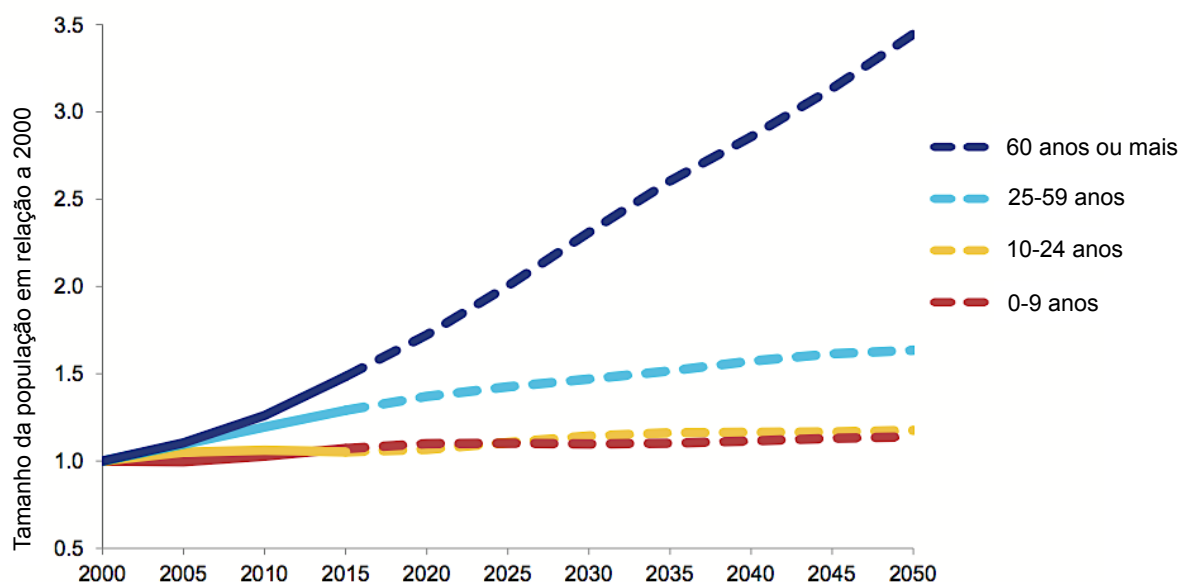
O envelhecimento é um processo inevitável, universal, cumulativo, irreversível, não patológico do declínio da capacidade funcional dos sistemas orgânicos, fazendo com que o organismo perca a capacidade de responder ao estresse do meio ambiente com o avançar da idade, aumentando o risco de doenças e a 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).

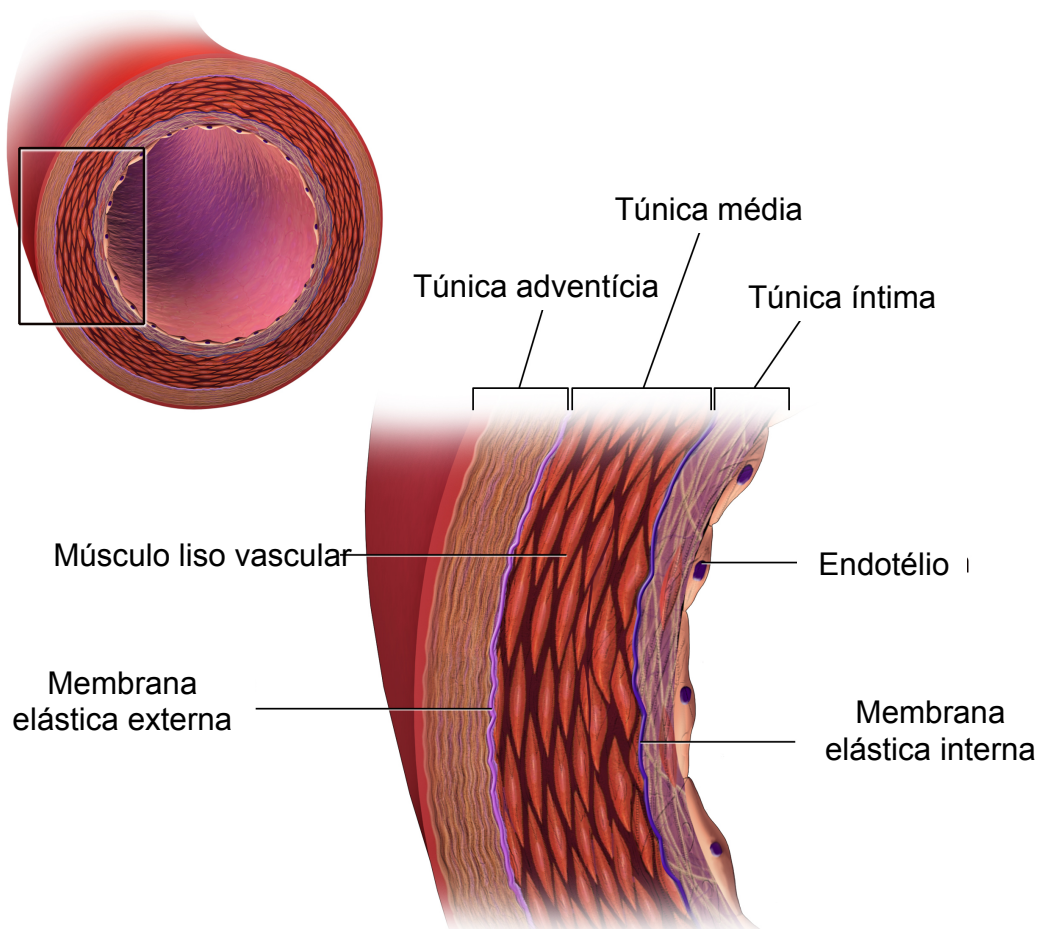
O envelhecimento continua sendo o mais forte fator de risco para DCV (WHO, 2015). As alterações moleculares decorrentes do envelhecimento no sistema cardiovascular tornam o envelhecimento em si um fator de risco para o desenvolvimento de DCV, mesmo após correção para fatores de risco cardiovasculares 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 túnicas) 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  $\text{PGI}_2$  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  $\text{PGI}_2$  (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 ( $\text{H}_2\text{S}$ ), 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; Féletou 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  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ), prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ) e prostaglandina  $\text{F}_{2\alpha}$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ), 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 fosfoinositídeo 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).

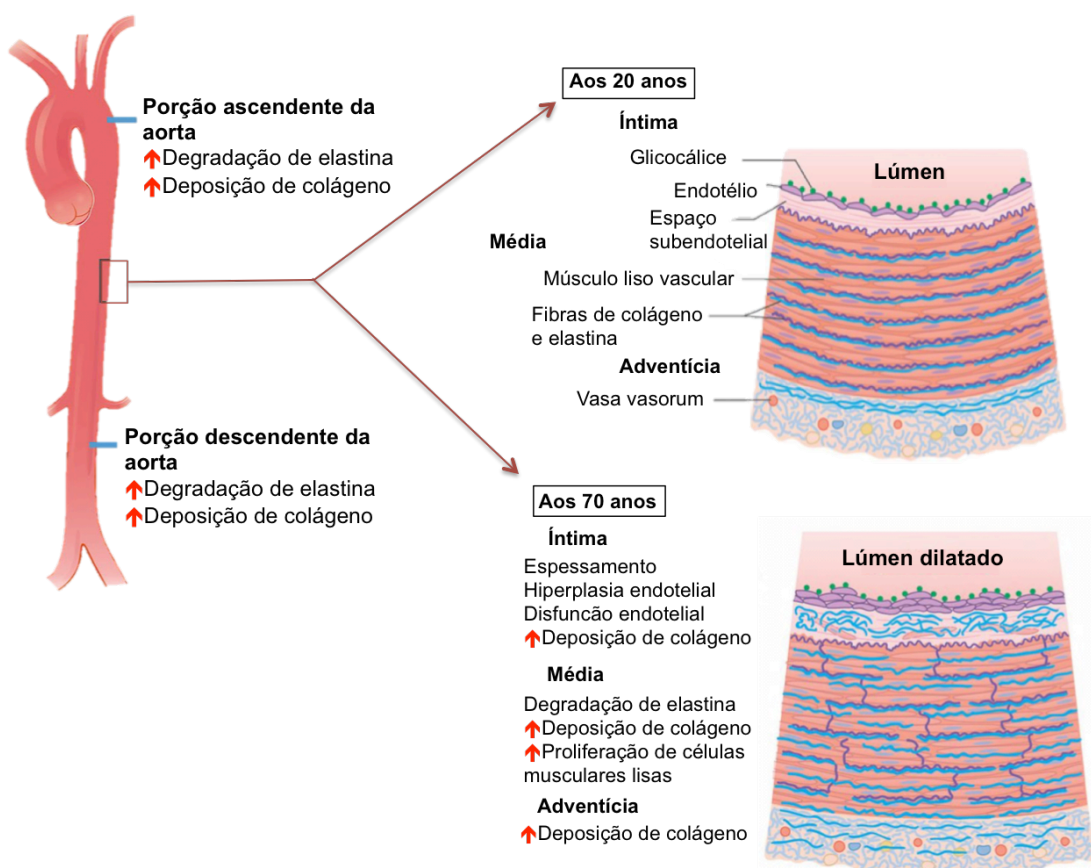
Alterações na conformação da eNOS, redução e/ou deficiência do co-fator essencial BH<sub>4</sub>, do substrato L-arginina ou na atividade das enzimas que ativam a eNOS podem levar a uma disfunção endotelial.

### **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).

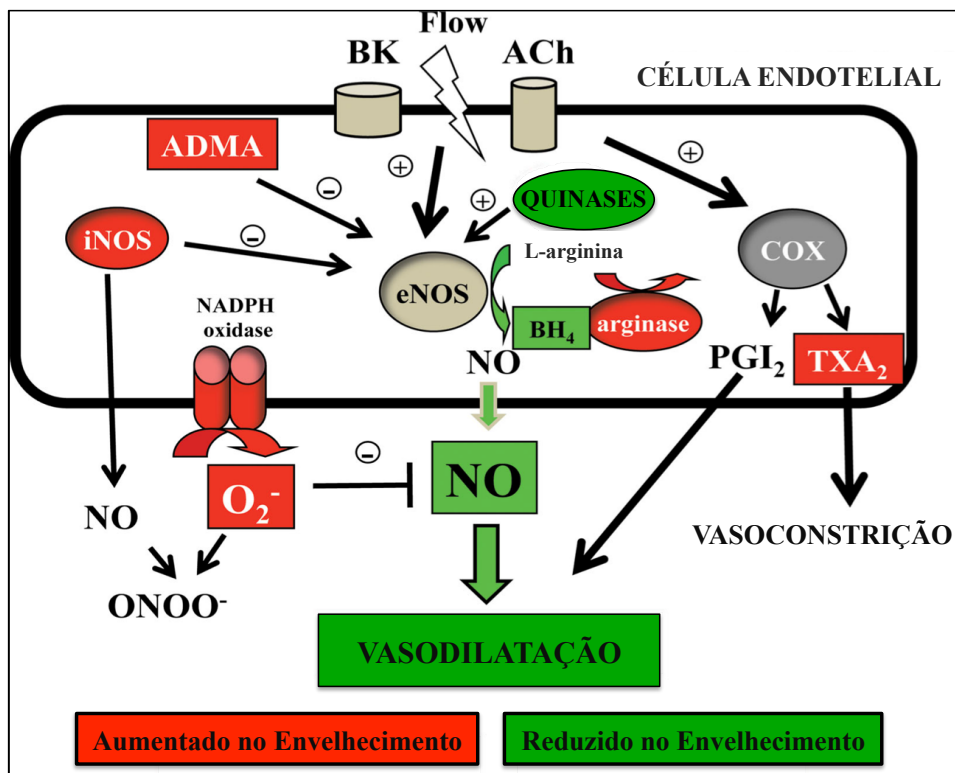
A disfunção endotelial é claramente multifatorial. No esquema demonstrado na **Figura 4** podemos observar alguns possíveis mecanismos envolvidos na disfunção endotelial induzida pelo envelhecimento, que têm como consequência um desequilíbrio caracterizado pelo aumento na produção de EROs, fatores vasoconstritores 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, conseqüentemente, 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.

## **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.

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](#)". *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.

BREDT 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.

BREDT 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.

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 periadventitial 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, FISSLTHALER 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 cardiological 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. Adaptative 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>.

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., VILLAFANA 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.; STROBERG, A.D.; RICQUIER, D. AND EMORINE, L.J. 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/WPA2015\\_Report.pdf](http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_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>