



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

AMANDA CHRISTINE DA SILVA SPONTON

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA
FEMORAL, NA PRESENÇA DO TECIDO ADIPOSEO
PERIVASCULAR, EM CAMUNDONGOS TREINADOS E
ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

CAMPINAS

2018

AMANDA CHRISTINE DA SILVA SPONTON

**AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA
FEMORAL, NA PRESENÇA DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR,
EM CAMUNDONGOS TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA
HIPERLIPÍDICA**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do Título de Doutora em Biologia
Funcional e Molecular, área de
concentração: Fisiologia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA AMANDA CHRISTINE DA SILVA
SPONTON E ORIENTADA PELA PROFESSORA
DOUTORA MARIA ANDRÉIA DELBIN.

Orientadora: MARIA ANDRÉIA DELBIN

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 140989/2016-1; FAPESP, 2013/02960-1

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Sp66a Sponton, Amanda Christine da Silva, 1983-
Avaliação da reatividade vascular da artéria femoral, na presença do tecido adiposo perivascular, em camundongos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica / Amanda Christine da Silva Sponton. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Maria Andréia Delbin.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tecido adiposo perivascular. 2. Reatividade vascular. 3. Exercícios físicos. 4. Dieta hiperlipídica. I. Delbin, Maria Andréia, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of vascular responsiveness of the femoral artery, in presence of perivascular adipose tissue, in exercised mice fed with high-fat diet

Palavras-chave em inglês:

Perivascular adipose tissue

Vascular reactivity

Exercise

Diet, High-fat

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Andréia Delbin [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Aline Mara dos Santos

Camila de Moraes

Mário Ângelo Claudino

Data de defesa: 03-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 03 de julho de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Andréia Delbin

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Profa. Dra. Aline Mara dos Santos

Profa. Dra. Camila de Moraes

Prof. Dr. Mário Ângelo Claudino

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pela minha vida, saúde e força para superar as dificuldades.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Andréia Delbin, agradeço pela oportunidade e confiança depositada em mim para conduzir este trabalho. Sou grata pelos ensinamentos, atenção, dedicação, paciência e, sobretudo pela amizade.

À minha família, em especial minha mãe Márcia, meu irmão Junior e meus queridos sogros, Paulo e Rosa, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Esta conquista pertence também a vocês.

Ao meu grande amor, Carlos, que através de sua dedicação, competência e entusiasmo pela pesquisa, me inspirou e incentivou a seguir seus passos. Agradeço pelo amor, carinho, cuidado, apoio e por dar sentido a minha vida.

Aos amigos Dani e Gui, Jad e Bola, Hygor e Lê, Carmem e Nádia, sou muito grata por todos os momentos de alegrias e dificuldades compartilhados. Vocês tornaram esta conquista possível e completa.

Aos professores da banca examinadora de qualificação, Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel, Profa. Dra. Fabíola Taufic Mônica Iglesias e Prof. Dr. Aaron Trask, e de defesa, Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente, Profa. Dra. Aline Mara dos Santos, Profa. Dra. Camila de Moraes e Prof. Dr. Mário Ângelo Claudino, agradeço pela discussão e contribuições para o presente estudo.

Agradeço a esta Universidade e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular e seu corpo docente, que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

Agradeço as agências de fomento pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não seria realizado: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão (FAEPEX) da UNICAMP.

RESUMO

O sedentarismo e a obesidade são considerados fatores de risco para a gênese das doenças cardiovasculares. Estudos recentes demonstram que adicional à relevância do endotélio, o tecido adiposo perivascular (PVAT) desempenha um importante papel no controle do tônus vascular. **Objetivo:** Assim, o objetivo deste estudo foi: 1) avaliar a função vascular da artéria femoral, na presença do PVAT, de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica; 2) investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio na função vascular da artéria femoral e seu PVAT nesses camundongos. **Metodologia:** Camundongos C57BL6/JUnib (20-24g) foram divididos em 4 grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Durante 16 semanas, os grupos c-SD e c-TR receberam ração balanceada e os grupos dh-SD e dh-TR receberam dieta hiperlipídica. Após 8 semanas, os grupos c-TR e dh-TR iniciaram o treinamento físico aeróbio (TFA) moderado em esteira, 5 dias/semana, 1 h/dia até o final do protocolo. Foram avaliados: a função vascular da artéria femoral, a expressão de proteínas, a produção de óxido nítrico (NO) e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), bem como fatores bioquímicos circulantes. **Resultados:** A alimentação com dieta hiperlipídica levou ao aumento do peso corporal e gordura epididimal, bem como nos valores circulantes de glicose, colesterol total, triglicerídeos, leptina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) nos grupos dh-SD e dh-TR comparados aos respectivos grupos controles. O TFA promoveu redução somente nos valores circulantes de TNF- α no grupo dh-TR comparado ao grupo dh-SD. A presença do PVAT reduziu a potência (pEC_{50}) e a resposta máxima (E_{MAX}) em resposta à acetilcolina no grupo dh-SD e o TFA preveniu essa alteração no grupo dh-TR. Nenhuma alteração foi encontrada na pEC_{50} ou E_{MAX} ao nitroprussiato de sódio em todos os grupos. Em resposta à endotelina-1, uma redução na pEC_{50} foi observada na presença do PVAT em todos os grupos, enquanto nenhuma alteração foi encontrada em resposta ao análogo do tromboxano A_2 . Um aumento na geração de EROs, bem como uma redução na produção de NO e expressão proteica da sintase endotelial do óxido nítrico fosforilada em serina 1177 foram observados na artéria femoral do grupo dh-SD. O TFA preveniu tais alterações vasculares observadas. No PVAT da artéria femoral, verificamos aumento no peso do tecido e na expressão proteica de leptina nos grupos dh-SD e dh-TR comparados aos

respectivos grupos controle. **Conclusão:** A presença do PVAT está envolvida no processo de disfunção endotelial na artéria femoral de animais alimentados com dieta hiperlipídica e o TFA foi eficaz em prevenir essas alterações, independente da redução do peso e acúmulo de gordura corporal.

Palavra chave: tecido adiposo perivascular, reatividade vascular, exercício físico e dieta hiperlipídica

ABSTRACT

Sedentary lifestyles associated with adiposity are considered important factors in the genesis of cardiovascular diseases. The role of perivascular adipose tissue (PVAT) in vascular function has recently been recognized. **Aim:** In this study we aim: 1) to evaluate the vascular function of the femoral artery, in presence of perivascular adipose tissue of mice fed with high-fat diet; 2) to investigate the effects of aerobic physical training on the vascular function of the femoral artery and its PVAT of these mice. **Methods:** Male mice C57BL6/JUnib (20-24 g) were divided into 4 groups: sedentary control (c-SD), trained control (c-TR), sedentary high-fat diet (dh-SD) and trained high-fat diet (dh-TR). For sixteen weeks the c-SD and c-TR groups were fed with standard chow and the dh-SD and dh-TR groups were fed with high-fat diet. After eight weeks, only the c-TR and dh-TR groups initiated aerobic physical training on a treadmill, 5 days/week, 60 minutes per session until the end of the full protocol. Were evaluated: vascular function of the femoral artery, protein expression, tissue nitric oxide (NO) production and reactive oxygen species (ROS) generation, as well as circulating biochemical factors. **Results:** The animals from dh-SD and dh-TR groups presented a significantly increased body weight, epididymal fat pad, blood glucose, total cholesterol, triglycerides, leptin, and tumoral necrose factor alpha (TNF- α), as compared with c-SD and c-TR groups, respectively. The exercise training was effective in reducing only the TNF- α concentration in dh-TR group. The relaxation response to acetylcholine did not modify in c-SD and c-TR groups, however the presence of PVAT reduced the potency (pEC_{50}) and maximal responses (E_{MAX}) in dh-SD group and the exercise training was effective in preventing these changes in dh-TR group. The presence of PVAT reduced the pEC_{50} in response to endothelin-1 in all groups. No difference was found in the response to sodium nitroprusside and thromboxane A_2 analog in all groups. The ROS generation was increased and NO production, as well as the protein expression of phosphor-endothelial nitric oxide synthase ($p-eNOS_{Ser1177}$) were decreased in femoral artery from dh-SD group. The exercise training was efficient to prevent the vascular alterations in dh-TR group. The amount of PVAT and the protein expression of leptin were markedly increased in dh-SD and dh-TR groups. **Conclusion:** In conclusion, the presence of PVAT is involved in the process of endothelial dysfunction in femoral artery from sedentary mice fed with high-fat diet. The aerobic exercise training

prevented the vascular alterations independent of the body weight and accumulated body fat are not reduced.

Key words: perivascular adipose tissue, vascular responsiveness, exercise training and high-fat diet.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Endotélio e músculo liso vascular.....	14
2.2 Tecido adiposo perivascular (PVAT)	17
2.3 Obesidade e disfunção vascular.....	21
2.4 Exercício físico.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Protocolo de treinamento físico.....	27
4.3 Obtenção das amostras de soro, artéria femoral e PVAT.....	29
4.4 Curvas concentração-resposta em artéria femoral.....	29
4.5 Expressão de proteínas em artéria femoral e PVAT.....	31
4.6 Produção de óxido nítrico em artéria femoral.....	32
4.7 Geração de espécies reativas de oxigênio em artéria femoral.....	33
4.8 Avaliação Histológica.....	34
4.9 Determinação de fatores bioquímicos séricos.....	34
4.10 Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1 Teste de exaustão e eficácia do protocolo de treinamento físico.....	36
5.2 Peso corporal e tecido adiposo epididimal.....	37
5.3 Parâmetros bioquímicos.....	38
5.4 Reatividade vascular em artéria femoral (PVAT-/PVAT+).....	39
5.5 Expressão proteica em artéria femoral (PVAT-).....	49
5.6 Produção de óxido nítrico (NO) em artéria femoral (PVAT+).....	50
5.7 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em artéria femoral.....	51
5.8 Expressão proteica em artéria femoral e PVAT.....	52
6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	54

7. DISCUSSÃO.....	56
8. CONCLUSÃO.....	65
9. REFERÊNCIAS.....	66
10. ANEXO.....	76
10.1 Anexo A - Comissão de Ética no Uso de Animais.....	76
10.2 Anexo B - Alteração de título do projeto no Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	77
10.3 Anexo C - Declaração de Direitos Autorais.....	78

1 INTRODUÇÃO

A obesidade aumenta de forma preocupante, sendo um grave problema de saúde pública mundial e o principal fator de risco para o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV) (MALNICK e KNOBLER, 2006). Caracterizada pelo aumento excessivo do número e tamanho dos adipócitos, bem como pela alteração no padrão de secreção de adipocitocinas pelo tecido adiposo, a obesidade promove um complexo desequilíbrio no organismo (SPALDING et al., 2008). Especificamente no sistema vascular, estudos têm demonstrado que o tecido adiposo ao redor dos vasos sanguíneos, chamado de tecido adiposo perivascular (PVAT), exerce um papel parácrino no controle do tônus vascular (YUDKIN et al., 2005). Já foi demonstrado que, em indivíduos saudáveis, a presença do PVAT resulta em efeito anticonstrítil, anti-inflamatório e antiaterogênico, o que contribui para a manutenção da função vascular (LI, et al. 2015). Porém, em indivíduos obesos, há uma alteração no fenótipo e no padrão de secreção do PVAT, que passa a contribuir para um estado pró-inflamatório, oxidativo e aterogênico, ocasionando a disfunção vascular e, posteriormente, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GREENSTEIN et al., 2009; KRANENDONK et al., 2015). Assim, novos estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de compreender os mecanismos pelos quais o PVAT modula a função vascular durante processos patológicos.

Sabe-se que o exercício físico aeróbio de intensidade moderada promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas (BOA et al., 2017). A inatividade física é o quarto maior fator de risco para mortes globais, sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças não transmissíveis, dentre elas a obesidade. Dessa forma, a prática regular de exercício físico tem sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS, 2010).

A obesidade apresenta uma alta associação com resistência à insulina e eventos cardiovasculares (FUSTER et al., 2016). Portanto, a redução do excesso de gordura e/ou a melhora no padrão de secreção de adipocinas pelo tecido adiposo são importantes para a prevenção e tratamento de doenças associadas à obesidade. O treinamento físico pode reduzir o acúmulo de gordura corporal,

incluindo os depósitos de PVAT, bem como promover adaptações metabólicas que modulam a expressão e secreção de adipocinas pelo tecido adiposo, reduzindo o estado pró-inflamatório observado na obesidade (LEE et al., 2016). Os estudos sugerem que tais efeitos do exercício físico, prevenindo e/ou atenuando a infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo, é fator determinante na função vascular (BOA et al., 2017). Recente estudo verificou que o treinamento físico aeróbio de moderada intensidade reduz o acúmulo de gordura corporal, incluindo os depósitos de PVAT da aorta torácica em ratos saudáveis (ARAÚJO et al., 2015). No entanto, alterações no PVAT em resposta ao exercício físico em animais obesos precisam ser melhores investigadas. Portanto, estudos envolvendo o exercício físico aeróbio e as possíveis alterações na função vascular moduladas pelo PVAT se tornam interessantes, principalmente quando associados à obesidade e suas complicações cardiovasculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENDOTÉLIO E MÚSCULO LISO VASCULAR

Os vasos sanguíneos são compostos basicamente por três camadas: a camada íntima, que está em contato com os elementos do sangue (essencialmente constituída pelas células endoteliais), a camada média (composta por células musculares lisas) e a camada adventícia (composta por tecido conjuntivo fibroso), que reveste a parte externa do vaso. Podem apresentar estrutura distinta refletindo suas diferentes funções ao longo do sistema vascular (COLAÇO et al., 2008).

Sabe-se que as células endoteliais são responsáveis pela síntese, metabolismo e liberação de grande variedade de mediadores, desempenhando papel fundamental na regulação do sistema cardiovascular (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1987; CARVALHO et al., 2003; ZANESCO e ANTUNES, 2007). Dentre as principais funções das células endoteliais podemos citar: modulação do tônus vascular; produção de mediadores envolvidos no crescimento, atividade, migração e morte celular; sensor de alterações hemodinâmicas; transmissor de sinais recebidos das células e da matriz extracelular (CARVALHO et al., 2003), entre outras. É importante destacar que a capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é fator essencial na regulação do tônus vascular, e envolve a ativação de fatores de crescimento celular, promovendo o remodelamento da parede arterial e a manutenção da integridade do endotélio (FISHER et al., 2001; SHYY e CHIEN, 2002).

O endotélio modula o tônus vascular pela síntese e liberação de substâncias vasoativas que promovem respostas vasodilatadores como: prostaciclina (PGI_2), óxido nítrico (NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e respostas vasoconstritores como: endotelinas (ET-1, ET-2 e ET-3), prostaglandina H_2 (PGH_2), tromboxano A_2 (TXA_2), angiotensina II (ANGII) e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (VANHOUTTE e MOMBOULI, 1996).

Dentre essas substâncias, o NO tem suas funções destacadas pela sua importância na resposta vasodilatadora, sendo capaz de difundir-se facilmente pelas membranas biológicas. É formado pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), cuja estrutura dimérica contém um grupamento heme e requer nicotinamida adenina

dinucleotídeo fosfato H⁺ [NAD(P)H], flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), (6R)-5,6,7,8-tetraidro-L-biopterina (BH₄) e o complexo cálcio (Ca⁺⁺)/calmodulina (CaM) como co-fatores para catalisar a oxidação de L-arginina a um derivado intermediário, N^G-hidroxi-L-arginina e, posteriormente a NO e citrulina (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001). Foram identificadas algumas isoformas da NOS, sendo duas constitutivas e uma induzível por estímulos imunológicos e/ou inflamatórios. A NOS constitutiva primeiramente descoberta no cérebro, medula espinhal e sistema nervoso periférico foi chamada de nNOS (ou NOS1) e àquela presente no endotélio foi chamada de eNOS (ou NOS3). A isoforma induzida foi então chamada de iNOS (ou NOS2). Embora haja aparente associação das três isoformas de NOS com sua denominação, ou seja, associação com os neurônios (nNOS), endotélio (eNOS) e a forma induzível (iNOS), todas são expressas em diversos tecidos. Uma importante diferença entre as isoenzimas é que, enquanto a nNOS e eNOS ligam-se à CaM e sua ativação responde a mudanças fisiológicas na concentração intracelular de íons Ca⁺⁺ ([Ca⁺⁺]), a iNOS possui a CaM ligada, sendo possível ativá-la em baixas [Ca⁺⁺] (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001).

A eNOS é amplamente expressa no endotélio vascular, sendo altamente sensível a estímulos químicos advindos de agonistas como a acetilcolina, bradicinina, histamina, catecolaminas, trifosfato de adenosina (ATP), entre outros. A interação agonista-receptor na célula endotelial promove a formação de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) que, por sua vez, induz a liberação de íons Ca⁺⁺ do retículo endoplasmático, elevando assim a [Ca⁺⁺] intracelular, formando o complexo Ca⁺⁺/CaM, ativando a eNOS que formará NO a partir de L-arginina. A eNOS também pode ser ativada por estímulos mecânicos, como o *shear stress* (força de cisalhamento) resultante do aumento do fluxo sanguíneo, que é um dos mais importantes estímulos para as células endoteliais produzirem NO independente de aumento na [Ca⁺⁺], por mecanismos dependentes de tirosina quinase (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001). É importante citar que nas células endoteliais, a eNOS é predominantemente localizada na região perinuclear com um pequeno reservatório localizado na cavéola, na membrana plasmática. Nesse contexto, a caveolina, uma proteína presente na cavéola, pode interagir e inibir a eNOS, sendo que essa inibição é antagonizada pelo complexo Ca⁺⁺/CaM.

Após sua formação, o NO difunde-se para a musculatura lisa vascular, ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que converte trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este, por sua vez, estimula a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que pode ativar canais de K^+ , induzindo a hiperpolarização, estimular o efluxo de Ca^{++} para o citoplasma da célula, inibir a geração de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) e, por fim, reduzir a $[Ca^{++}]$ levando à vasodilatação. Além disso, a PKG pode diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{++} , reduzindo a contração muscular (IGNARRO et al., 1988; MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991). Além de seu papel fundamental na vasodilatação, o NO liberado é um potente inibidor da agregação e adesão plaquetária e leucocitária à parede vascular, inibe a mitogênese e a proliferação das células musculares lisas vasculares, por um mecanismo mediado por GMPc (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991).

As células musculares lisas vasculares (CMLVs) modulam diversas funções, incluindo: vasoconstrição e vasodilatação; síntese de colágeno, elastina e proteoglicanos; elaboração de fatores de crescimento e citocinas; migração e proliferação celular (COLAÇO et al., 2008). São, normalmente, o elemento celular predominante na camada média dos vasos e, em repouso são fusiformes e têm núcleos alongados únicos.

A função contrátil das CMLVs é mediada por filamentos citoplasmáticos que contém actina e miosina (COLAÇO et al., 2008). O processo de contração da musculatura lisa ocorre após aumento intracelular da $[Ca^{++}]$, sendo a fonte desse íon o influxo do meio extra para o intracelular ou pela liberação do retículo sarcoplasmático (VASCONCELOS e CARVALHO, 2005). O Ca^{++} presente no citosol liga-se a proteína calmodulina formando o complexo Ca^{++}/CaM que, por sua vez, ativa a enzima miosina quinase, responsável por fosforilar o sítio ativo da cadeia leve de miosina, fazendo com que esta proteína ligue-se aos filamentos de actina promovendo a contração muscular (GUYTON e HALL, 2011). Agonistas contráteis ligam-se aos seus receptores específicos acoplados a proteína G, e a cascata de sinalização é iniciada pela ativação da fosfolipase C que catalisa a formação de segundos mensageiros, a partir de fosfolípidos de membrana, gerando IP_3 e diacilglicerol (DAG). O IP_3 liga-se aos seus receptores no retículo sarcoplasmático promovendo a liberação de Ca^{++} para o citosol. O DAG ativa proteína quinase C (PKC), que por sua vez, fosforila proteínas de membrana ligadas a canais para Ca^{++}

do tipo L, favorecendo o influxo de Ca^{++} para o citosol. O processo de contração é mantido até que a enzima miosina fosfatase catalise a defosforilação da cadeia leve de miosina, inativando o complexo actina-miosina, promovendo relaxamento ou tônus basal (WEBB, 2003). Após evento excitatório, o relaxamento e a homeostase do Ca^{++} se dá por sua recaptação pelos compartimentos de estoques intracelulares e pelo efluxo para o meio extracelular (VASCONCELOS e CARVALHO, 2005).

2.2 TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR (PVAT)

Adicional a relevância do endotélio, foi demonstrado o importante papel do tecido adiposo perivascular (PVAT) no controle do tônus vascular. O PVAT era considerado apenas como um suporte mecânico para os vasos sanguíneos e por isso foi rotineiramente removido para o estudo da função vascular (GAO, et al., 2007). Localizado ao redor da maioria dos vasos sanguíneos sistêmicos (com exceção da circulação cerebral), encontra-se ao exterior da camada adventícia vascular não possuindo nenhuma estrutura laminar ou barreira que os separe (PVAT e camada adventícia), podendo assim influenciar diretamente na função vascular (GAO et. al., 2007).

Encontra-se na literatura a descrição de três diferentes tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco (WAT), considerado o principal reservatório de energia, que secreta um grande número de hormônios e citocinas que modulam o metabolismo (MATHIEU et al., 2010); o tecido adiposo marrom (BAT), cuja a função está relacionada à termogênese e ao controle da temperatura corporal e, para tanto, um alto dispêndio energético é necessário (CYPESS et al., 2009; VIRTANEN et al., 2009); e posteriormente descrito, o tecido adiposo bege, o qual é originalmente um tecido adiposo branco, mas que após determinados estímulos, passa a apresentar adipócitos com característica de marrom (WU et al., 2012). Essa conversão do WAT em bege é frequentemente denominada *browning*. Esse tipo de tecido adiposo contribui tanto para a homeostase da temperatura corporal quanto para o sistema endócrino-metabólico (WU et al., 2012).

O PVAT pode ser classificado de acordo com sua diferente localização anatômica (Figura 1). Tanto em roedores como em humanos, o PVAT da aorta torácica é descrito como misto, por apresentar adipócitos de ambos, WAT e BAT,

com predominância de BAT (BROWN et al., 2014). Por outro lado, o PVAT da aorta abdominal (PADILLA et al., 2013), bem como das artérias periféricas de menor calibre, como as artérias carótida, mesentérica e femoral, o PVAT é predominantemente WAT (BROWN et al., 2014). Embora as artérias coronárias não possuam PVAT em murinos, outras espécies animais como coelho e porco, bem como humanos, apresentam a presença de PVAT nesse leito vascular, sendo que, em humanos, o PVAT nas artérias coronárias foi classificado como bege (GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2016).

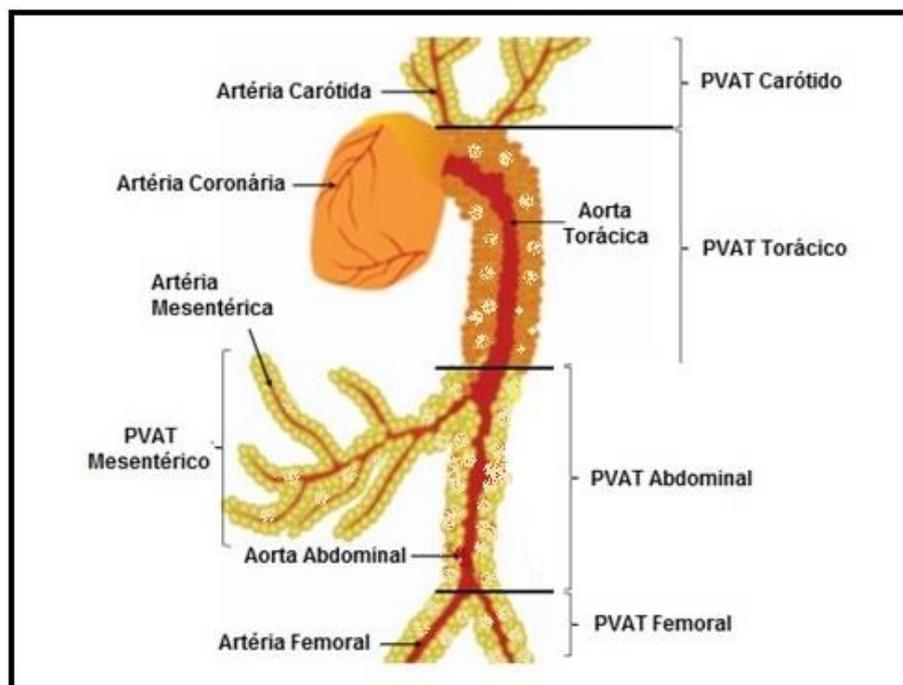


Figura 1: Tipos de tecido adiposo perivascular (PVAT) em roedores. (Adaptado de BROWN et al., 2014).

Sabe-se que o PVAT é responsável pela liberação de grande variedade de substâncias tais como: adipocinas pró- e anti-inflamatórias, inúmeras citocinas e quimiocinas (RAJSHEKER et al., 2010), bem como substâncias do sistema renina-angiotensina (GALVEZ-PRieto et al., 2008) e diversas moléculas gasosas (NO, peróxido de hidrogênio- H_2O_2 , anion superóxido- O_2^- e sulfeto de hidrogênio- H_2S) (GAO et al., 2007; FANG et al., 2009). O PVAT pode, ainda, expressar importantes complexos tais como: receptores de adipocinas, proteína desacopladora 1 (UCP-1), coativador do receptor gama ativado por peroxissoma proliferador (PPAR- γ), receptor β_3 adrenérgico, receptor de citocinas, receptor de angiotensina II, enzima

NADPH oxidase, eNOS (DASHWOOD et al., 2007) e todas as isoformas da superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Ec-SOD), lipoxigenases e metaloproteases (SZASZ e WEBB, 2012).

Em 1991, Soltis e Cassis desmonstraram que a presença do PVAT em aorta de ratos atenuava o efeito contrátil a noraepinefrina, evidenciando um efeito anticontrátil do PVAT (SOLTIS e CASSIS, 1991). Entretanto, apenas em 2002, Lohn e colaboradores reavaliaram o PVAT e constataram que esse tecido era capaz de produzir e liberar fatores que influenciavam o tônus vascular (LOHN et al., 2002). Posteriormente, outros estudos passaram a investigar os possíveis mecanismos envolvidos na resposta anticontrátil do PVAT (DUBROVSKA et al., 2004; GOLLASCH et al., 2004; WITHERS et al., 2014).

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar o efeito anticontrátil que o PVAT exerce na vasculatura. Estudos evidenciaram que o PVAT produz um fator relaxante derivado do adipócito (ADRF) que promove a abertura de canais de K^+ dependentes de ATP, canais de K^+ dependentes de voltagem, e ainda canais de K^+ ativados por cálcio de baixa condutância, causando hiperpolarização das células do músculo liso vascular e relaxamento (LOHN et al., 2002; VERLOHREN et al., 2004; GAO et al., 2007). Outros trabalhos demonstraram a liberação de H_2O_2 pelas células do PVAT, promovendo a formação de GMPc e relaxamento vascular (GAO et al., 2007; WANG e SCHERER, 2008).

Além disso, foi demonstrado que a leptina possui um efeito direto no relaxamento vascular, mesmo na ausência do PVAT, em artéria mesentérica de cães (MOHAMMED et al., 2007), aorta de coelhos (SAHIN e BARISKANER, 2007) e em humanos (NAKAGAWA et al., 2002), sendo essa resposta mediada por mecanismos dependentes de NO (RAHMOUNI e HAYNES, 2005). Outro estudo verificou que a leptina sinaliza a produção/liberação de NO pelo PVAT em artéria mesentérica de camundongos (GIL-ORTEGA et al., 2010).

Outro mecanismo proposto trata-se da ativação de receptores β_3 adrenérgicos no PVAT que sinalizam a liberação de adiponectina, essa por sua vez, atua em seu receptor nas células do músculo liso vascular promovendo hiperpolarização e relaxamento (KADOWAKI e YAMAUCHI 2005; AGHAMOHAMMADZADEH et al., 2012). Por fim, a fenilefrina e serotonina, atuando em receptores específicos no PVAT estimulam a produção de NO via NOS e

consequente relaxamento da célula muscular lisa (MALINOWSKI et al., 2008; AGHAMOHAMMADZADEH et al., 2012).

Sabe-se, portanto, que em indivíduos saudáveis, o PVAT secreta grande variedade de fatores, tanto relaxantes como contráteis, que contribuem para a manutenção do tônus vascular (LI et al., 2015). Porém, em indivíduos obesos, possíveis alterações no fenótipo e no padrão de secreção do PVAT, podem contribuir para um estado pró-inflamatório, oxidativo e aterogênico (CHANG et al., 2013), ocasionando a disfunção vascular e, posteriormente, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Figura 2).

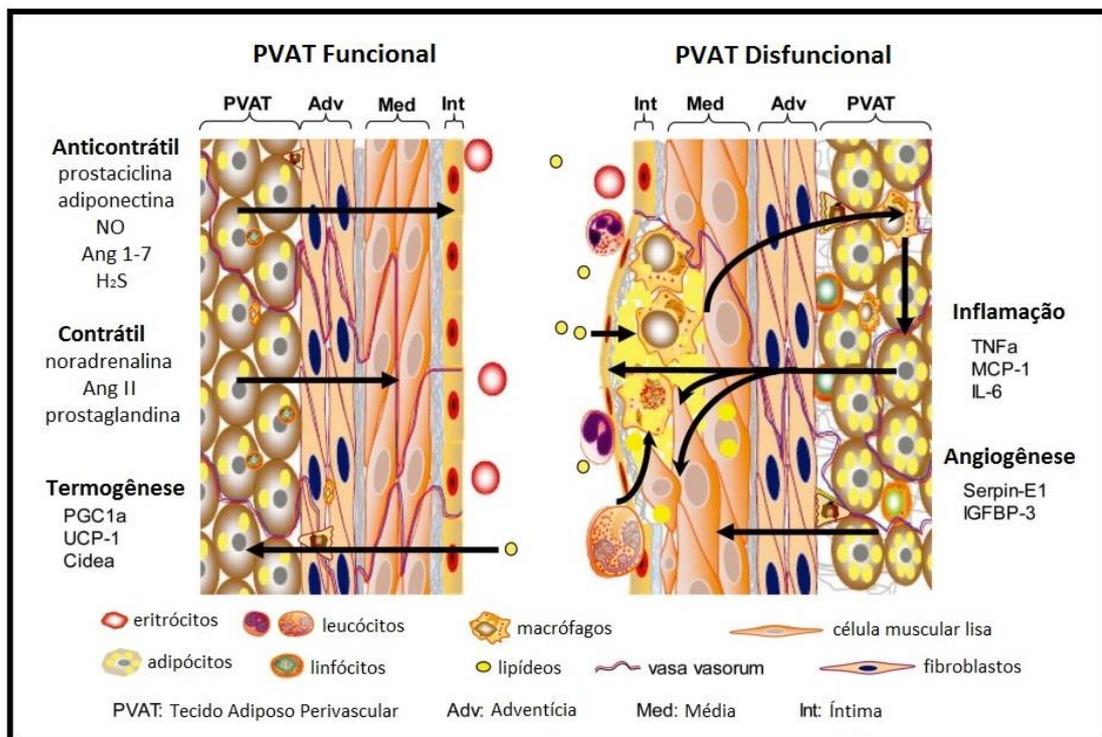


Figura 2: Tecido Adiposo Perivascular (PVAT) funcional e disfuncional (Adaptado de CHANG et al., 2013). Ang: angiotensina; H₂S: sulfato de hidrogênio; IGFBP-3: proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina; IL-6: interleucina-6; MCP-1: proteína quimiotática de monócitos; NO: óxido nítrico; PGC1 α : co-ativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; UCP-1: proteína desacopladora-1.

Sabe-se ainda, que o papel regulatório do PVAT é diferente e específico para cada leito vascular. O efeito anticonstrátil do PVAT na aorta torácica não é observado na aorta abdominal (VICTORIO et al., 2016). Os mecanismos envolvidos nesta diferença foram associados a menor expressão de eNOS e produção de NO

no PVAT da aorta abdominal comparado ao PVAT da aorta torácica (VICTORIO et al., 2016). Assim, os estudos sugerem que a função do PVAT varia de acordo com o leito vascular estudado, com a característica do tecido adiposo presente no PVAT e também em qual espécie os efeitos do PVAT estão sendo avaliados.

2.3 OBESIDADE E DISFUNÇÃO VASCULAR

Alguns trabalhos acerca da obesidade e suas comorbidades abordam a função e/ou disfunção do tecido adiposo, o que parece ser um fator determinante no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas associadas à obesidade (BLUHER, 2009; HAJER et al., 2008). A obesidade é uma desordem multifatorial influenciada pela interação de fatores genéticos, comportamentais e ambientais, incluindo controle do apetite, conteúdo nutricional alimentar e gasto energético. A interação desses fatores leva ao acúmulo de gordura, aumentando o volume (hipertrofia) e número (hiperplasia) de adipócitos, induzindo potencialmente ao processo inflamatório, hipóxia e estresse metabólico e oxidativo, resultando em disfunção do tecido adiposo (SPALDING et al., 2008).

Essa alteração no padrão de secreção pelos adipócitos promove um estado pró-inflamatório local e sistêmico, que prejudica a função vascular, conforme demonstrado em ensaios de reatividade vascular em roedores (DONATO et al., 2012; VILA e SALICES, 2005). Também em estudos com humanos (FORNONI e RAIJ, 2005), demonstraram que altos níveis de ácidos graxos livres (AGL), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), leptina e resistina comprometem a vasodilatação dependente do endotélio.

Após ligação com seus receptores de membrana nas células endoteliais, as adipocinas ativam múltiplas vias de sinalização intracelular promovendo alterações nas funções celulares. As adipocinas que têm efeitos similares sobre as funções das células endoteliais, tais como a regulação da angiogênese, tônus vascular, coagulação sanguínea e respostas imunes, muitas vezes ativam vias de sinalização comum. A ativação da via fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) - proteína quinase B (Akt), por exemplo, sinaliza produção de NO e PGI₂, que medeiam tanto a angiogênese como o relaxamento dependente do endotélio. As vias quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), janus quinases (JAK) e transdutor de sinal

e ativador de transcrição 3 (STAT3) modulam a resposta angiogênica por meio da expressão gênica de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) e metalopeptidases de matriz (MMP-2 e MMP-9). As EROs e a proteína quinase ativada por mitógenos p38 (p38 MAPK) ativam o fator nuclear kappa B (NF- κ B) que modula a expressão gênica de fatores pró-trombóticos (SERPINE-1) e pró-inflamatórios (molécula de adesão celular vascular 1 -VCAM-1; molécula de adesão intracelular 1- ICAM-1; e E-Selectina) (NORTHCOTT et al., 2012). Dessa forma, os estudos descrevem que o estado pró-inflamatório, pró-trombótico e pró-oxidativo associado à obesidade promove disfunção vascular por efeitos diretos na redução da biodisponibilidade do NO (BENDALL et al., 2005; CHEN et al., 2010; MOHAMED et al., 1995) ou indiretamente, pelo aumento da lipólise e liberação de AGL e redução da sensibilidade à insulina (KIM et al., 2006; PITTAS et al., 2004; RASK-MADSEN et al., 2003; SCHINZARI et al., 2010).

Além do tecido adiposo visceral, já se sabe da importante participação do PVAT nas complicações vasculares decorrentes da obesidade. Foi demonstrado que em indivíduos obesos, além do aumento de gordura visceral e do peso corporal, há um aumento do depósito de PVAT (FITZGIBBONS e CZECH, 2014), com alterações morfológicas e funcionais, que favorecem um estado inflamatório, oxidativo e aterogênico (CAO, 2014). Em modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, a massa total do PVAT está aumentada, com desequilíbrio na secreção de adipocinas, como redução de adiponectina (KADOWAKI e YAMAUCHI, 2005), aumento na secreção de leptina, interleucinas, TNF- α , MCP-1, EROs, AngII, favorecendo o recrutamento de células inflamatórias, a proliferação e migração de células musculares lisa vasculares (CMLVs) e reduzindo sua capacidade anticontrátil (POLICE et al., 2009).

Diferentes modelos de indução da obesidade em animais com severa disfunção metabólica e exacerbado aumento do PVAT, demonstraram perda do efeito anticontrátil promovido pelo PVAT (MA et al., 2010; PAYNE et al., 2010). No entanto, os estudos que avaliaram o estágio inicial da obesidade (após dois meses de dieta hiperlipídica), quando as alterações metabólicas são moderadas, identificaram um aumento da produção de NO pelo PVAT e melhora da função vascular em artéria mesentérica de camundongos, como um mecanismo compensatório durante o desenvolvimento da obesidade (GIL-ORTEGA et al., 2010; FERNÁNDEZ-ALFONSO et al., 2013). Por outro lado, os autores demonstraram,

posteriormente, que tais efeitos são completamente perdidos após oito meses de dieta hiperlipídica, quando a obesidade ocasionou severas alterações metabólicas (GIL-ORTEGA et al., 2014). Esses estudos sugerem, portanto, que no início da obesidade o PVAT exerce um papel protetor, modulando a resposta vascular, porém essa atuação passa a ser deletéria após longos protocolos experimentais de obesidade. Assim, na obesidade, a alteração no padrão de secreção do PVAT passa a contribuir para um estado pró-inflamatório, oxidativo e aterogênico, ocasionando a disfunção vascular e, posteriormente, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (OZEN et al., 2015).

2.4 EXERCÍCIO FÍSICO

Sabe-se que o exercício físico aeróbio de moderada intensidade promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas. (BOA et al., 2017). A inatividade física é o quarto maior fator de risco para mortes globais, sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças não transmissíveis, dentre elas a obesidade. Assim, a prática regular de exercício físico tem sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS, 2010).

Os mecanismos pelos quais o exercício físico de moderada intensidade promove benefícios cardiovasculares e endócrino-metabólicos envolvem múltiplas vias de sinalização celular e molecular e despertam interesse em diversas linhas de pesquisa. Na função endotelial esses benefícios estão relacionados ao aumento na produção de substâncias vasoativas como o NO e/ou ao aumento de sua biodisponibilidade nas células endoteliais (DELBIN et al., 2012; WOODMAN et al., 2005). Tais efeitos do exercício físico no endotélio vascular são mediados pela força de cisalhamento, e como resultado desse aumento no fluxo laminar, a deformação de sensores mecânicos nas células endoteliais sinaliza liberação de substâncias vasodilatadoras pela ativação de canais de Ca^{++} , levando a liberação de PGI_2 e relaxamento do músculo liso via AMPc. Além disso, ativa a via PI3K-Akt promovendo fosforilação da eNOS e conseqüente aumento na produção de NO e resposta vasodilatadora. Ainda, essa força mecânica é transmitida pelo citoesqueleto para locais de adesão, onde as integrinas ligadas à matriz extracelular conduzem essa

deformação ativando proteínas quinase ativadas por mitógenos, que liberam NF- κ B. Este por sua vez, liga-se a regiões promotoras de múltiplos genes-alvo no núcleo, incluindo o gene da eNOS. O aumento exponencial na liberação de NO em resposta a força de cisalhamento, além de promover uma resposta relaxante no músculo liso, induz ao aumento na expressão da extracelular superóxido dismutase (ecSOD), de maneira a inibir a degradação de NO por EROs e conseqüentemente a formação de peroxínitrito (ONOO⁻) (GIELEN et al., 2010).

Especificamente na obesidade, a prática regular de exercício físico está positivamente associada a melhores resultados no prognóstico da doença. Como descrito anteriormente, a obesidade apresenta uma alta associação com resistência à insulina e eventos cardiovasculares (FUSTER et al., 2016). Portanto, a redução do excesso de gordura e a melhora no padrão de secreção de adipocinas pelo tecido adiposo são importantes para a prevenção e tratamento de doenças associadas à obesidade. O treinamento físico reduz o acúmulo de gordura corporal, incluindo os depósitos de PVAT, bem como promove adaptações metabólicas que modulam a expressão e secreção de adipocinas pelo tecido adiposo, reduzindo o estado pró-inflamatório observado na obesidade (LEE et al., 2016). No entanto, muitas dessas adaptações no tecido adiposo ocorrem independentes de grande perda de peso corporal.

Foi demonstrado, em camundongos obesos, que o treinamento físico reduz o tamanho dos adipócitos, o recrutamento de células inflamatórias e a estrutura de macrófagos em volta de adipócitos necrosados no tecido adiposo mesentérico (HACZEYNI et al., 2015). Além disso, o exercício físico induz a alteração de macrófagos do tipo M1, que apresentam características inflamatórias, para macrófagos-M2, com um perfil mais imunossupressor (BOA et al., 2017). Em outros estudos com camundongos obesos, o exercício preveniu a infiltração de macrófagos-M1 e reduziu o número total de macrófagos na fração estromal vascular (KAWANISHI et al., 2013), bem como reduziu TNF- α , IL-6, ICAM1, VCAM1, CD11c e TLR4 no tecido adiposo gonadal (KAWANISHI et al., 2010). Esses dados sugerem que o exercício físico previne e/ou atenua a infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo, melhorando a função vascular (BOA et al., 2017). No entanto, essas alterações em resposta ao exercício físico ainda não foram verificadas no PVAT.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

1) Avaliar a função vascular da artéria femoral, na presença do PVAT, de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica; 2) Investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio na função vascular da artéria femoral e de seu PVAT nesses camundongos;

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os níveis circulantes de:

✓ Glicose, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), leptina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

- Avaliar a resposta relaxante e contrátil em anéis de artéria femoral, com endotélio intacto na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) de tecido adiposo perivascular:

✓ Resposta relaxante à acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP);

✓ Resposta contrátil ao análogo do tromboxano A2 (U46619) e endotelina1 (ET-1);

- Avaliar a expressão proteica em artéria femoral (PVAT-):

✓ Sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS); sintase endotelial do óxido nítrico fosforilada em serina1177 (peNOS_{Ser1177});

✓ Receptores de: leptina (Ob-R); adiponectina (AdipoR1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α R1);

- Avaliar a expressão proteica em tecido adiposo perivascular (PVAT) da artéria femoral:

✓ Leptina, adiponectina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α);

- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em artéria femoral (PVAT+).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEUA-IB-UNICAMP - Protocolo: 4260-1).

Camundongos machos C57BL6/JUnib com quatro semanas de idade foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório-CEMIB) e foram mantidos no Biotério 1 da Área da Fisiologia do Instituto de Biologia da Unicamp em caixas coletivas com quatro animais em cada. Os animais com 6-7 semanas de idade (20-24 gramas) foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Figura 3):

1. Controle sedentário (**c-SD**): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com ração controle balanceada e sedentários;
2. Controle treinado (**c-TR**): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com ração controle balanceada e submetidos ao treinamento físico aeróbio;
3. Dieta hiperlipídica sedentário (**dh-SD**): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com dieta hiperlipídica e sedentários;
4. Dieta hiperlipídica treinado (**dh-TR**): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico aeróbio.

Todos os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro (12/12 h) e tiveram livre acesso à água e alimentação. Pelo período de dezesseis semanas os grupos c-SD e c-TR receberam ração controle balanceada, contendo aproximadamente 3,6 Kcal/g (Nuvilab CR1, PR-Brasil). Pelo mesmo período os grupos dh-SD e dh-TR receberam dieta hiperlipídica, contendo aproximadamente 6,2 Kcal/g (composição de: 32% de carboidratos, 20,3% de proteínas, 38% de lipídios, 5% de fibras, 3,5% de minerais e 1,2% de vitaminas; PragSoluções Biociências, SP-Brasil).

A eficácia da dieta hiperlipídica em induzir ao acúmulo de gordura foi verificada ao final do protocolo experimental pela avaliação do peso corporal e do acúmulo de tecido adiposo branco na região epididimal. O peso corporal dos animais

foi mensurado ao início do protocolo experimental e semanalmente até o final do estudo.

Após a oitava semana do protocolo, os animais dos grupos c-TR e dh-TR iniciaram o treinamento físico aeróbio.

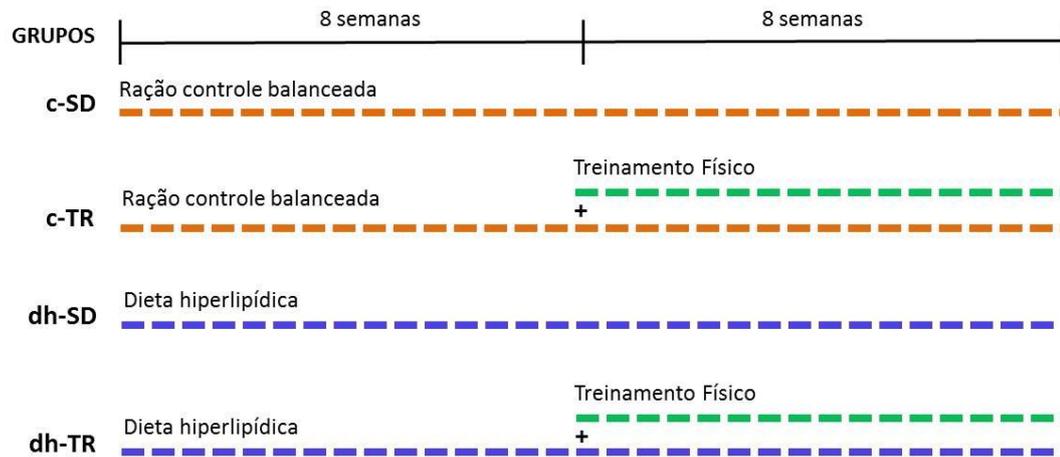


Figura 3: Grupos experimentais.

4.2 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento físico aeróbio realizado foi o de corrida em esteira ergométrica (Gesam, SP-Brasil). Uma semana antes do início do protocolo experimental os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira onde a velocidade imposta consistiu de aumentos progressivos variando a velocidade em 5 metros/minuto (m/min) no primeiro dia até 10 m/min no quinto dia da semana, e o tempo variando em 10 min no primeiro dia até 20 min no quinto dia. Somente os animais adaptados à esteira foram utilizados no estudo. Essa adaptação visou minimizar o possível estresse causado nos animais devido ao uso da esteira

Após o período de adaptação os animais iniciaram o programa de treinamento físico com intensidade moderada (60-70% da velocidade máxima). A velocidade de treinamento foi calculada na primeira semana pela realização do teste de esforço máximo. Durante o teste de esforço a velocidade da esteira é aumentada em 5 m/min (iniciando em 5 m/min) a cada 3 minutos, 0% de inclinação até a exaustão. A velocidade máxima atingida é utilizada para determinar a intensidade moderada do treinamento. O critério utilizado para a determinação da exaustão do

animal e interrupção do teste é o momento em que o camundongo não consegue mais correr mediante estímulo e incremento da velocidade da esteira (BROOKS et al., 1978). É importante salientar que o teste de esforço máximo foi realizado em três momentos distintos:

- 8ª semana – antes de iniciar o treinamento físico, objetivando determinar a intensidade do treinamento (todos os animais foram submetidos ao teste);
- 12ª semana – na metade do protocolo de treinamento físico, objetivando ajustar a carga de trabalho e manter a intensidade proposta para o treinamento (somente os animais dos grupos treinados foram submetidos ao teste – resultados não apresentados);
- 16ª semana – ao final do protocolo experimental, objetivando avaliar a eficácia do treinamento físico empregado no estudo (todos os animais foram submetidos ao teste).

Após o primeiro teste de esforço máximo, a partir do segundo dia, o treinamento físico foi iniciado com velocidade de 10 m/min aumentando progressivamente até atingir a velocidade final correspondente a 60-70% da velocidade máxima estabelecida anteriormente para cada animal (velocidade de treino: entre 10 m/min – 15 m/min no início do treinamento até a 8ª semana e entre 15 m/min – 20 m/min após a metade do treinamento até o final). Progressões de tempo na duração das sessões também foram realizadas até que os animais conseguissem permanecer correndo por 60 minutos. Os animais foram agrupados para o treinamento físico de acordo com a velocidade de treinamento. O programa teve duração total de 8 semanas de treinamento em esteira, 5 dias por semana, com duração de 60 min por sessão e velocidade da seguinte maneira: 10 min a 40% da velocidade máxima, 40 min a 60-70% da velocidade máxima e 10 min a 40% da velocidade máxima, 0% de inclinação e durante o período da manhã.

Ao término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas (para verificação dos efeitos crônicos do treinamento físico aeróbio) e jejum de 12 horas, quando então foram submetidos à eutanásia e coleta de tecidos.

4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO, ARTÉRIA FEMORAL E PVAT

Os valores de glicose sanguínea (mg/dl) de jejum foram avaliados antes da coleta de sangue e tecidos, utilizando uma gota de sangue caudal e os valores foram constatados por fitas reativas de teste (Advantage Roche, SP, BRA) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche) seguindo as instruções do fabricante. A antecipação desta coleta visou excluir a interferência do uso de anestésico na medida de glicemia de jejum.

Os animais foram então anestesiados com 2 g/Kg de uretano intraperitoneal (LI et al., 2009), e pela punção cardíaca foram obtidas amostras de sangue (1 ml). As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rotações/minuto para obtenção do soro e foram congelados em freezer a -80 °C para posteriores análises. Em seguida, os animais foram eutanasiados e a artéria femoral foi removida cuidadosamente e banhada em solução preparada de Krebs contendo (mM): NaCl- 118; NaHCO₃- 25; glicose- 5,6; KCl- 4,7; KH₂PO₄- 1,2; MgSO₄.7H₂O- 1,17 e CaCl₂.2H₂O- 2,5.

Foram coletadas amostras de tecido adiposo branco da região epididimal, que foram pesadas para avaliação da indução de adiposidade.

4.4 CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA EM ARTÉRIA FEMORAL

A artéria femoral distal foi isolada e cortada em anéis (4 anéis de 2 milímetros cada) na ausência e na presença de tecido adiposo perivascular (PVAT-/PVAT+, respectivamente). Para isolar e medir o comprimento de cada anel foi utilizado um microscópio e retículo micrométrico (Nikon Instruments, NY-EUA). Os anéis foram amarrados em sistema de miógrafo multicanais para pequenos vasos (Model 610M, DMT A/S, Aarhus NA-Dinamarca) utilizando dois fios de tungstênio com 20 µm de diâmetro cada (ilustrado na Figura 4 abaixo) e mantidos em 5 ml da solução de Krebs aquecida a 37°C, pH 7,4 e areada com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

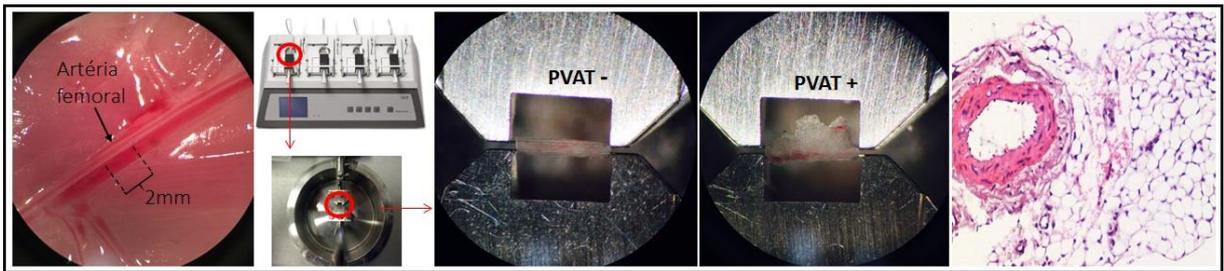


Figura 4. Imagens demonstrativas de anéis de artéria femoral amarrados em sistema de miógrafo multicanaís para pequenos vasos e imagem histológica representativa de tecido adiposo perivascular da artéria femoral.

A tensão basal inicial foi calculada pela normalização da dimensão dos vasos utilizando uma curva de circunferência interna por tensão da parede (MULVANY e HALPERM, 1977). Pelos valores gerados de circunferência interna o diâmetro de cada anel foi calculado. As alterações de tensão do tecido foram obtidas utilizando transdutores isométricos e registradas em sistema PowerLab 400™ de aquisição de dados (Software versão 7,0, AD Instruments, MA-EUA).

Após o período de 45 minutos de estabilização, os anéis da artéria femoral foram contraídos com KCl 80 mM até a contração máxima e, em seguida, lavados com solução de Krebs. Um teste para avaliar a viabilidade do endotélio foi realizado e apenas os anéis que apresentaram relaxamento superior a 60% da pré-contracção ao análogo do tromboxano A₂ (U46619) foram utilizados no estudo. Curvas cumulativas concentração-resposta à acetilcolina (ACh: 100 pM – 100 μM) e nitroprussiato de sódio (SNP: 100 pM – 300 μM) foram obtidas. O relaxamento foi plotado como porcentagem da pré-contracção induzida pelo análogo do tromboxano A₂ (U46619) em concentração suficiente para produzir 50-80% da contração máxima.

Os efeitos contráteis do análogo do tromboxano A₂ (U46619; 100 pM – 3 μM) e da endotelina-1 (ET-1; 100 pM – 300 nM) foram também avaliados. Os valores de contração foram plotados em mN por milímetro (mm) de artéria (mN/mm).

As curvas concentração-resposta foram obtidas por meio do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). Os dados obtidos foram avaliados pela equação descrita:

$$E = E_{MAX} / \{ [1 + (10^c/10^x)^n] + \Phi \}$$

Onde **E** representa o efeito do agonista na resposta tecidual; **E_{MAX}** representa a resposta máxima que o agonista produziu; **c** representa o logaritmo da **EC₅₀**, definida como a concentração do agonista que produz metade da resposta máxima; **x** representa o logaritmo das concentrações do agonista, o termo exponencial **n** é o coeficiente angular ou inclinação, parâmetro que define o tipo de curva concentração-resposta obtida; por fim o símbolo **Φ** representa a resposta observada na ausência do agonista. A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: **E_{MAX}**, **log EC₅₀** (**pEC₅₀**) e **n** foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA-EUA) com o valor basal **Φ** = zero.

4.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM ARTÉRIA FEMORAL E PVAT

Amostras de artéria femoral e de seu tecido adiposo perivascular (PVAT) foram coletadas separadamente, congeladas a -80°C e, posteriormente homogeneizadas (homogeneizador de vidro) em tampão de Ripa (Upstate, Temecula, CA-EUA). O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante recolhido para a determinação da concentração de proteína (Pierce BCA Protein Assay kit, IL-EUA). A quantidade necessária para aplicar 50 μg (artéria femoral) e 75 μg (PVAT) de proteína no gel de acrilamida foi calculada para cada amostra. As amostras foram aplicadas no gel com SDS (Lauril Sulfato Sódico) poliacrilamida (SDS-PAGE – 4-15% Mini-Protean TGX – BioRad, CA-EUA) e submetidas a eletroforese em um sistema Mini-Protean II (Electrophoresis Cell, BioRad, CA-EUA).

Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF Hybond, Amersham Biosciences, NJ-EUA). Para detecção das proteínas de interesse na artéria femoral, as membranas foram incubadas com anticorpo primário para eNOS (BD Bioscience, CA-EUA), peNOS_{Ser1177} (Cell Signaling Technology, MA-EUA), receptor de leptina (Ob-R) isoformas longa e curta (Novus Biologicals, CO-EUA), receptor de adiponectina (AdipoR1) (Novus Biologicals, CO-EUA) e receptor de fator de necrose tumoral alfa (TNF α R1) (Santa Cruz, Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA), utilizando a diluição (1:1000). Para detecção das proteínas de interesse no PVAT da artéria femoral, as

membranas foram incubadas com anticorpo primário para leptina (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), adiponectina (Cell Signaling Technology, MA-EUA) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (Biolegend), utilizando a diluição (1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas e posteriormente incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) correspondente ao primário em questão. Ao final, as proteínas de interesse foram detectadas por uma reação de quimiluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Biosciences) e reveladas em fotodocumentador ImagemQuant LAS4000 (GE Healthcare, NY-EUA). Todo o protocolo de incubação foi repetido com anticorpo primário para detecção de α -actina (1:5000, Abcam, CA-EUA) na artéria femoral e α -tubulina (1:1000, Santa Cruz, Biotechnology Inc, Dallas, TX, USA) no PVAT, seguido de respectivo anticorpo secundário. A expressão de α -actina e α -tubulina foi mensurada para normalização da expressão das proteínas quantificadas. O software ImageJ (National Institutes of Health, MD-EUA) foi utilizado para quantificação densitométrica das bandas. Todos os resultados são apresentados como relativo ao grupo c-SD (a densitometria do grupo c-SD para cada proteína foi estabelecida como sendo igual a 1 e a partir deste valor a densitometria dos demais grupos foi calculada).

4.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM ARTÉRIA FEMORAL

A produção tecidual de NO foi avaliada pela análise da fluorescência ao 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), como previamente descrito (DELBIN et al., 2012). O diacetato (DAF-2 DA) atravessa a membrana celular e é hidrolisado por esterases do citosol em DAF-2. Na presença de NO e oxigênio, DAF-2 é convertido em triazol emitindo uma fluorescência verde (KOJIMA et al., 1998).

Para realização do ensaio, um anel de artéria femoral PVAT+ de aproximadamente 4 mm foi imerso em meio para congelamento Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek Inc., Torrance, EUA), e então criosecções de 10 μ m de espessura foram obtidas em criostato a -25°C. Entre 2-3 cortes de cada amostra foram colocados sobre lâminas com silanina e incubados com 100 μ l de tampão fosfato 0,1 M (pH=7,4) contendo cálcio (0,45 mM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Posteriormente, uma nova incubação foi realizada com tampão fosfato e DAF-2 (8

μM) por 30 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação “basal”. O segundo corte da mesma amostra foi incubado com o mesmo tampão (contendo cálcio e DAF-2), porém após 15 minutos de incubação foi acrescentado $30 \mu\text{M}$ de acetilcolina e a incubação permaneceu por mais 15 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação ACh. As imagens foram captadas em microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Japão), utilizando-se objetiva 20X acoplada a uma câmara fotográfica (DS-U3, Nikon, Japão). Para a fluorescência de DAF-2 utilizamos o filtro de fluoresceína e sua quantificação foi realizada utilizando o Software ImageJ 1.46p (NIH, EUA). Mediu-se a densidade integrada em 10 regiões aleatórias na camada média vascular de cada corte com área fixa e, a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra. A quantificação da produção de NO pela fluorescência de DAF-2 será apresentada pela diferença entre a intensidade densitométrica após estímulo com $30 \mu\text{M}$ de ACh e a intensidade densitométrica do Basal. Os dados de fluorescência ao DAF-2 foram normalizados relativamente aos dados do grupo controle (c-SD), para os quais foi atribuído um valor médio igual a 1.

4.7 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) EM ARTÉRIA FEMORAL

A avaliação da produção tecidual de EROs foi realizada pela análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina (DHE), como previamente descrito (DAVEL et al., 2012). A DHE atravessa a membrana celular e, na presença de espécies reativas de oxigênio, é oxidada em brometo de etídio, o qual se intercala ao DNA, emitindo uma fluorescência vermelha quando é excitado em 488 nm e com um espectro de emissão de 610 nm. Esta sonda é particularmente mais sensível à oxidação por ânion superóxido, em comparação a outras espécies reativas como o peroxinitrito, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, ânion hipoclorito e oxigênio singleto (PIECH et al., 2003).

Os cortes transversais de artéria femoral PVAT+ (obtidos conforme descrito no item 4.6) foram incubados por 30 minutos com $100 \mu\text{l}$ de tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH}=7,4$) contendo DTPA (10^{-4} M) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C . Posteriormente, uma nova incubação foi realizada com tampão fosfato e DHE

(D23107, Life Technologies, CA, EUA – $2 \times 10^{-6} \text{M}$) por 30 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz. As imagens foram captadas em microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Japão), utilizando-se objetiva 20X acoplada a uma câmara fotográfica (DS-U3, Nikon, Japão). Para a fluorescência de DHE utilizamos o filtro de rodamina e sua quantificação foi realizada utilizando o Software ImageJ 1.46p (NIH, EUA). Mediu-se a densidade integrada em 10 regiões aleatórias, incluindo o tecido adiposo perivascular, de cada corte com área fixa e, a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra. Os dados de fluorescência ao DHE foram normalizados relativamente aos dados do grupo controle (c-SD), para os quais foi atribuído um valor médio igual a 1.

4.8 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Amostras de artéria femoral e de seu tecido adiposo perivascular (PVAT) foram coletadas e fixadas em formalina 10% e, posteriormente, os tecidos foram submetidos à desidratação com concentrações crescentes de etanol (70% - 100%) e de xilol e então embebidos em parafina. Secções transversas ($5 \mu\text{m}$) foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para caracterização morfológica. As imagens foram captadas em microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Japão), equipado com câmara (DS-U3, Nikon, Japão) e NIS Elements Basic Research (3.2 Software, Nikon, Japão), utilizando-se objetiva de 20X.

4.9 DETERMINAÇÃO DE FATORES BIOQUÍMICOS SÉRICOS

Amostras de soro foram utilizadas para determinação dos níveis de colesterol total (CT, mg/dl) e triglicerídeos (TG, mg/dl) avaliados pelo método enzimático utilizando-se kit específico e seguindo as instruções do fabricante (Katal, MG-Brasil), bem como para a determinação das concentrações de leptina e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelo método de ELISA utilizando-se kit comercial e seguindo as instruções do fabricante (R&D Systems, MN-EUA).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores experimentais estão expressos como média \pm EPM de n experimentos indicados em cada caso. A normalidade dos dados foi avaliada pelo *Kolmogorov-Smirnov test*. Análise de variância, ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni, foi empregada para avaliar as diferenças entre os grupos experimentais; e para a análise intra grupo (PVAT+ versus PVAT-) foi utilizado o Test t de *Student* não pareado, ambas as análises utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software 5.0, San Diego, CA-EUA) e identificadas em cada caso. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE EXAUSTÃO E EFICÁCIA DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Antes de iniciar o treinamento físico (Pré-Treinamento), todos os animais apresentaram resultados similares para as variáveis analisadas (tempo, distância e velocidade máxima) no teste de esforço máximo (Figura 5, painéis A, B e C). A intensidade moderada do treinamento físico para os animais dos grupos c-TR e dh-TR foi estabelecida após o teste de esforço máximo inicial (60-70% da velocidade máxima atingida no teste). O mesmo teste foi realizado na metade do protocolo de treinamento (12ª semana), com objetivo de ajustar a carga de trabalho e manter a intensidade proposta no estudo (somente os animais dos grupos treinados foram submetidos ao teste – resultados não apresentados).

Ao final do protocolo de treinamento físico (Pós-Treinamento), os animais dos grupos treinados apresentaram melhores resultados quando comparados aos animais dos grupos sedentários (Figura 5, painéis D, E e F), demonstrando a eficácia do TR empregado no estudo.

- Tempo total (c-TR ↑**111%** vs c-SD), (dh-TR ↑**66%** vs dh-SD) e (dh-TR ↓**20%** vs c-TR);
- Distância total percorrida (c-TR ↑**300%** vs c-SD), (dh-TR ↑**134%** vs dh-SD) e (dh-TR ↓**36%** vs c-TR);
- Velocidade máxima de exaustão (c-TR ↑**97%** vs c-SD), (dh-TR ↑**60%** vs dh-SD) e (dh-TR ↓**19%** vs c-TR).

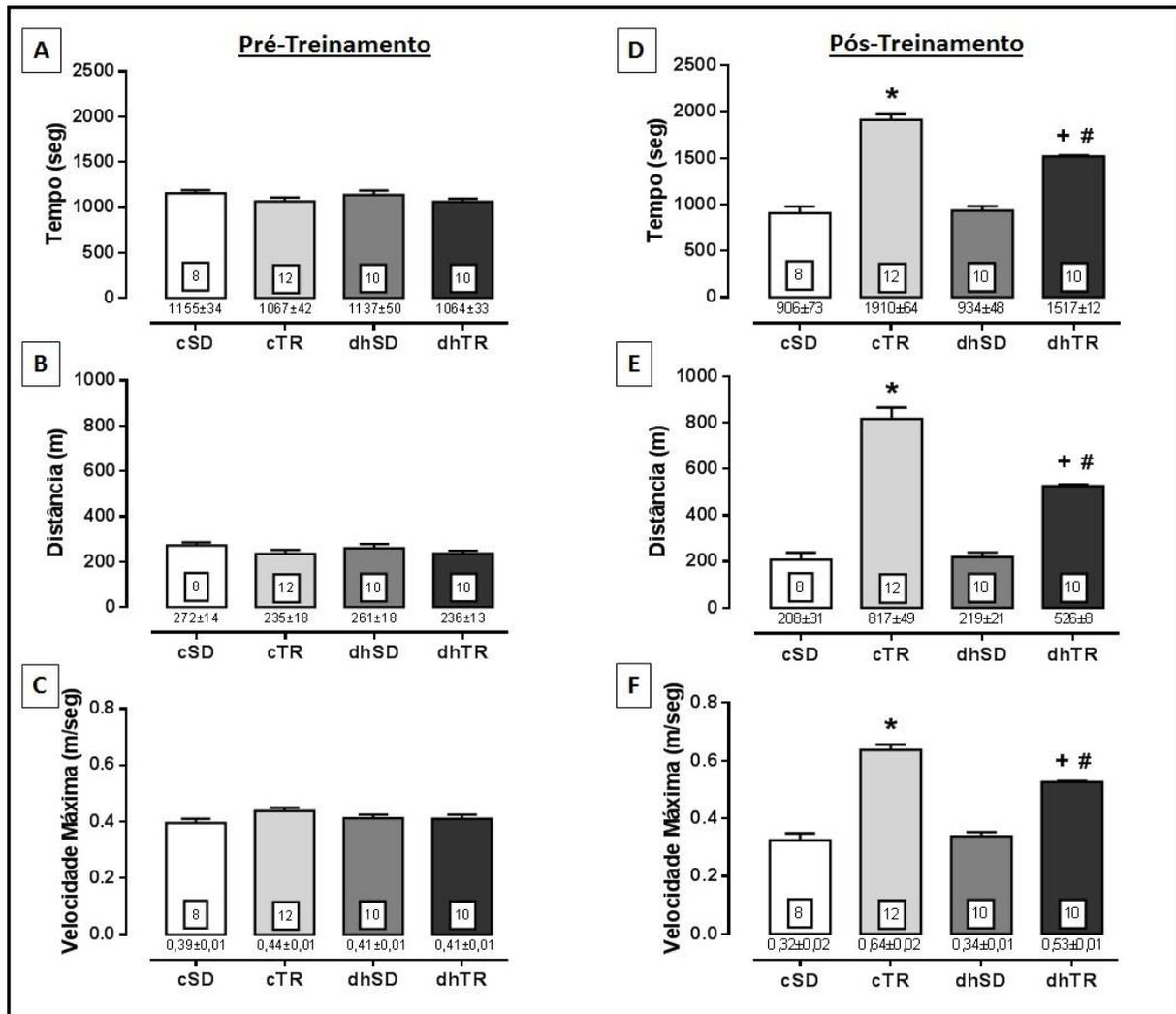


Figura 5: Teste de esforço máximo: tempo total inicial (painel A) e final (painel D), distância total percorrida inicial (painel B) e final (painel E) e velocidade máxima percorrida inicial (painel C) e final (painel F). Grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD. + $p < 0,05$ comparado ao grupo dh-SD. # $p < 0,05$ comparado ao grupo c-TR.

5.2 PESO CORPORAL E TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL

Inicialmente, o peso corporal foi similar em todos os grupos (Figura 6, painel A). Ao final do protocolo experimental, os grupos dh-SD e dh-TR apresentaram um aumento significativo do peso corporal e gordura epididimal quando comparados aos grupos c-SD e c-TR. O treinamento físico aeróbio não alterou esses valores (Figura 6, painéis B e C).

→ Peso corporal final (dh-SD ↑**59%** vs c-SD) e (dh-TR ↑**54%** vs c-TR);

→ Gordura epididimal (dh-SD ↑**265%** vs c-SD) e (dh-TR ↑**355%** vs c-TR).

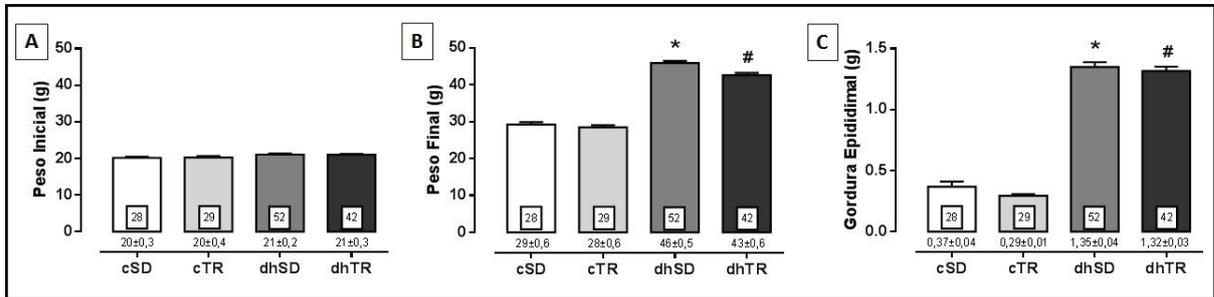


Figura 6. Peso corporal inicial (painel A) e final (painel B) e gordura epididimal (painel C). Grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD. # $p < 0,05$ comparado ao grupo c-TR.

5.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As concentrações circulantes de glicose, colesterol total e triglicerídeos aumentaram nos grupos dh-SD e dh-TR quando comparados aos grupos c-SD e c-TR (Figura 7, painéis A, B e C). O treinamento físico aeróbio não alterou esses parâmetros.

→ Glicemia (dh-SD ↑**62%** vs c-SD) e (dh-TR ↑**32%** vs c-TR);

→ Colesterol Total (dh-SD ↑**184%** vs c-SD) e (dh-TR ↑**139%** vs c-TR);

→ Triglicerídeos (dh-SD ↑**94%** vs c-SD) e (dh-TR ↑**73%** vs c-TR).

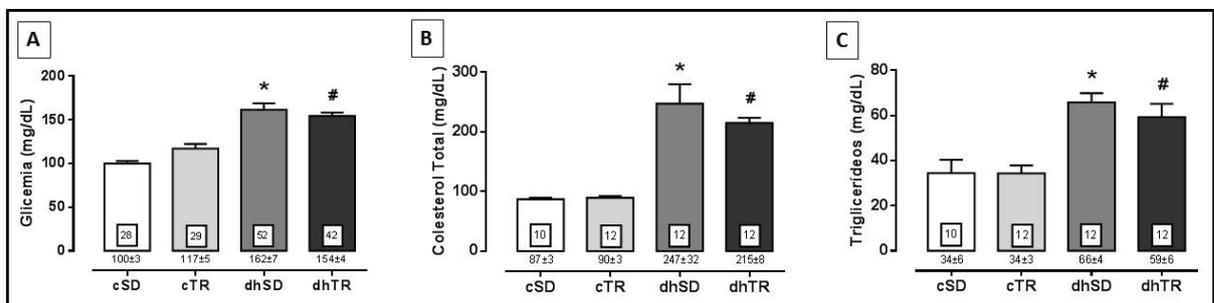


Figura 7: Glicemia (mg/dL, painel A), colesterol total (mg/dL, painel B) e triglicerídeos (mg/dL, painel C). Grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD. # $p < 0,05$ comparado ao grupo c-TR.

Os animais dos grupos dh-SD e dh-TR apresentaram elevada concentração de leptina circulante quando comparados aos grupos controles (c-SD e c-TR) (Figura 8, painel A). O treinamento físico não modificou os valores dessa variável nos animais dos grupos treinados. Por outro lado, foi observado um aumento nas concentrações de TNF- α circulante nos animais do grupo dh-SD comparados ao grupo c-SD e o treinamento físico aeróbio reduziu esses valores no grupo dh-TR (Figura 8, painel B).

→ Leptina (dh-SD \uparrow 10000% vs c-SD) e (dh-TR \uparrow 9186% vs c-TR);

→ TNF- α (dh-SD \uparrow 173% vs c-SD) e (dh-TR \downarrow 50% vs dh-SD).

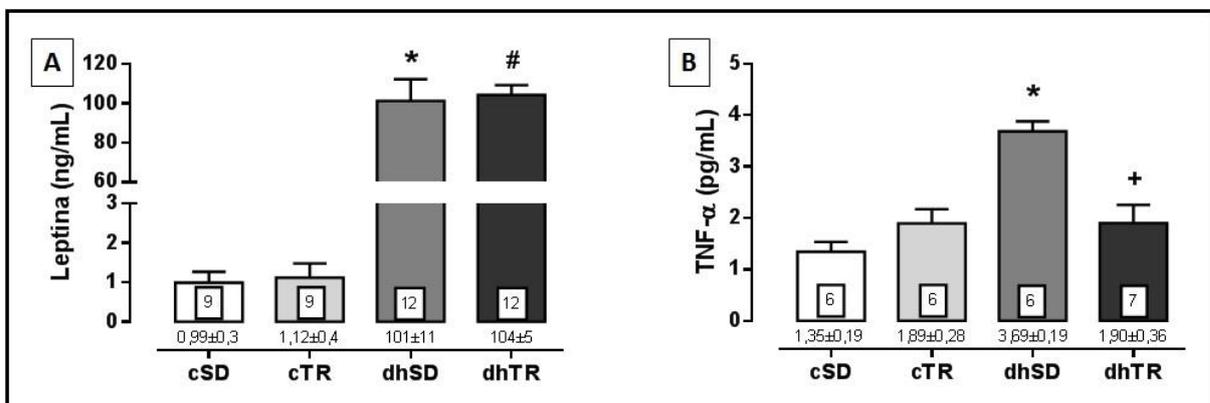


Figura 8: Leptina (ng/mL, painel A) e TNF-alfa (pg/mL, painel B). Grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (*n*) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. * p <0,05 comparado ao grupo c-SD. # p <0,05 comparado ao grupo c-TR; + p <0,05 comparado ao dh-SD.

5.4 REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIA FEMORAL (PVAT-/PVAT+)

Os animais dos grupos dh-SD e dh-TR apresentaram um aumento no peso do PVAT da artéria femoral quando comparados aos grupos controles. O treinamento físico não alterou esses valores (Figura 9, painel A).

A análise histológica qualitativa do PVAT da artéria femoral apresentou similaridade entre os grupos controles (cSD e cTR), e evidente hipertrofia dos adipócitos dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica (dhSD e dhTR), sem alteração pelo treinamento físico (Figura 9, painel B).

→ Peso do PVAT: (dh-SD ↑**930%** vs c-SD) e (dh-TR ↑**715%** vs c-TR).

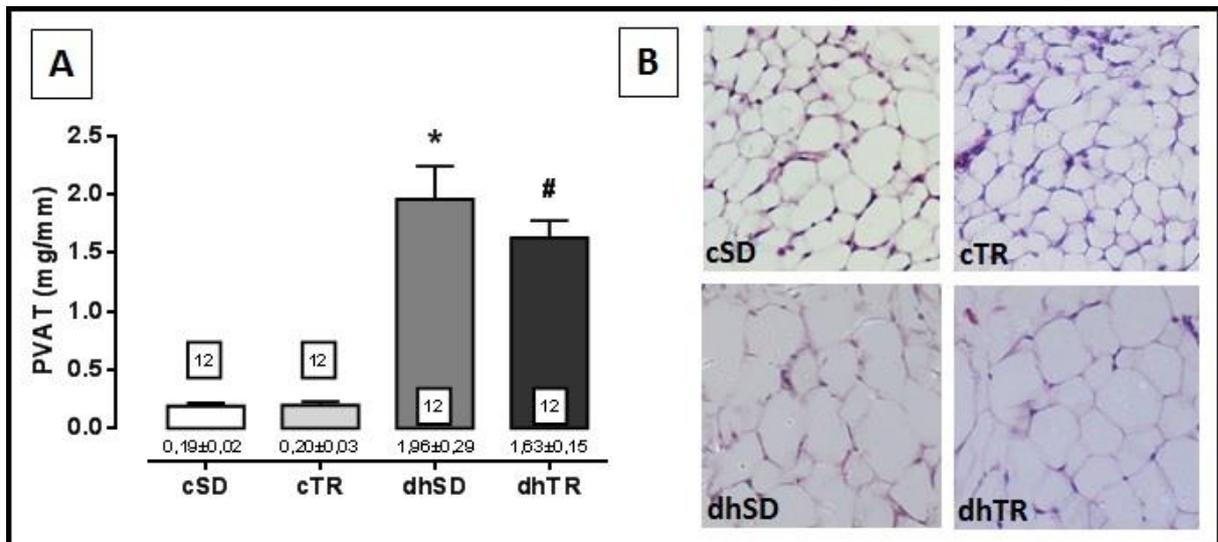


Figura 9: Peso do tecido adiposo perivascular (PVAT) da artéria femoral (mg/mm, painel A) e imagens histológicas representativas do PVAT da artéria femoral em objetiva de 20X (painel B). Grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. O número de animais (*n*) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD. # $p < 0,05$ comparado ao grupo c-TR.

Nenhuma alteração foi observada no diâmetro interno e no delta de contração máxima induzida pelo cloreto de potássio 80 mM (ΔKCl) em anéis de artéria femoral, tanto na comparação PVAT- vs PVAT+ dentro do mesmo grupo, quanto na comparação entre os grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores de diâmetro interno (μm) e delta de contração máxima ao cloreto de potássio (ΔKCl , mN/mm) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-) e presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

Grupos – Artéria Femoral					
		c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
Diâmetro Interno (μm)	PVAT-	273 \pm 10	274 \pm 8	265 \pm 11	276 \pm 9
	PVAT+	271 \pm 11	275 \pm 7	269 \pm 15	272 \pm 11
ΔKCl (mN/mm)	PVAT-	11 \pm 2	10 \pm 1	14 \pm 2	13 \pm 2
	PVAT+	11 \pm 1,5	11 \pm 1	12 \pm 3	11 \pm 1

Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi entre 8 e 12. Test t de *Student* (comparação entre PVAT- vs PVAT+ no mesmo grupo) ANOVA 2- vias (comparação entre os grupos).

Os agonistas vasodilatadores acetilcolina (ACh; 100 pM - 100 μM) e nitroprussiato de sódio (SNP; 100 pM - 300 μM) produziram relaxamento concentração-dependente em anéis de artéria femoral, com endotélio intacto, na ausência (PVAT-) e presença (PVAT+) de tecido adiposo perivascular. Nenhuma alteração foi observada nos valores de potência (pEC_{50} - Tabela 2) e resposta máxima (E_{MAX} - Figuras 12 e 13) ao SNP de todos os grupos experimentais. Por outro lado, a presença do PVAT nos anéis do grupo dh-SD reduziu em cinco vezes os valores de pEC_{50} (Tabela 2) e E_{MAX} em resposta à ACh, tanto na comparação entre os grupos experimentais (Figura 10, painel B), quanto na comparação PVAT- vs PVAT+ dentro do próprio grupo (Figura 11, painel C). O treinamento físico aeróbio foi efetivo em prevenir essas alterações no grupo dh-TR (Figura 10, painel B e Figura 11, painel D).

Tabela 2: Valores de potência (pEC_{50}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-) ou presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD), controle treinado (c-TR) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

		GRUPOS - pEC ₅₀			
		c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
ACh	PVAT-	7,55±0,10	7,57±0,11	7,37±0,11	7,69±0,16
	PVAT+	7,41±0,08	7,38±0,10	6,66±0,20*§	7,58±0,14 ⁺
SNP	PVAT-	7,88±0,11	8,31±0,10	8,19±0,11	8,07±0,09
	PVAT+	7,97±0,11	8,07±0,12	8,06±0,16	7,82±0,13

Valores de potência são representados como $-\log$ da concentração do agonista necessária para produzir 50% da resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi entre 8 e 12. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD. $^{\dagger}p < 0,05$ comparado ao dh-SD. Test t de Student. § comparado ao respectivo grupo PVAT-.

Comparação entre os grupos experimentais, nos anéis **PVAT+** (Figura 10, painel B):

→ pEC₅₀ à ACh (dh-SD ↓10% vs c-SD) e (dh-TR ↑14% vs dh-SD);

→ E_{MAX} à ACh (dh-SD ↓10% vs c-SD) e (dh-TR ↑10% vs dh-SD).

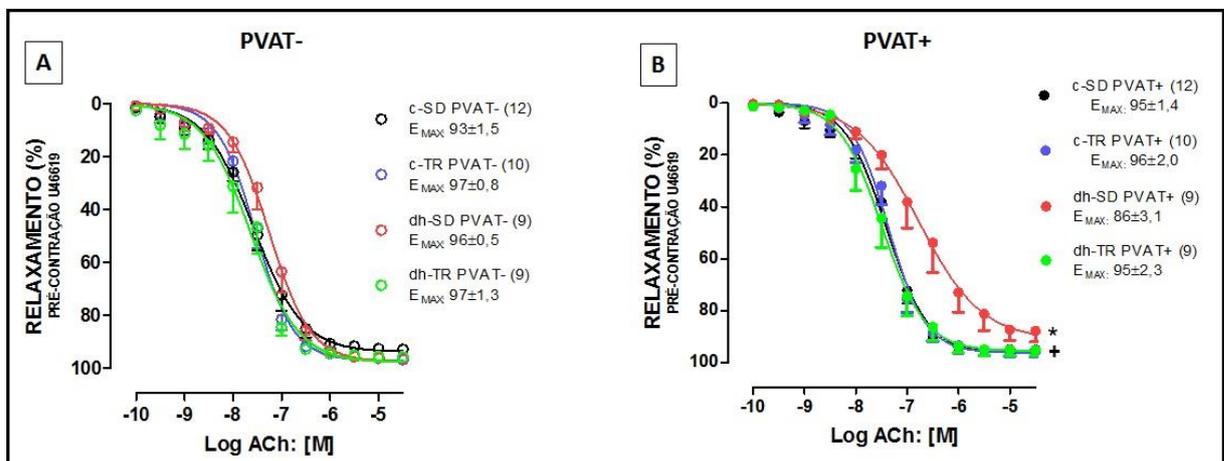


Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, painel A) ou na presença (PVAT+, painel B) de tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). E_{MAX}: Resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. E_{MAX} * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD. E_{MAX} $^{\dagger}p < 0,05$ comparado ao dh-SD.

Comparação PVAT- vs PVAT+ dentro do mesmo grupo dh-SD (Figura 11, painel B):

→ pEC₅₀ e E_{MAX} à ACh: PVAT+ ↓10% vs PVAT-

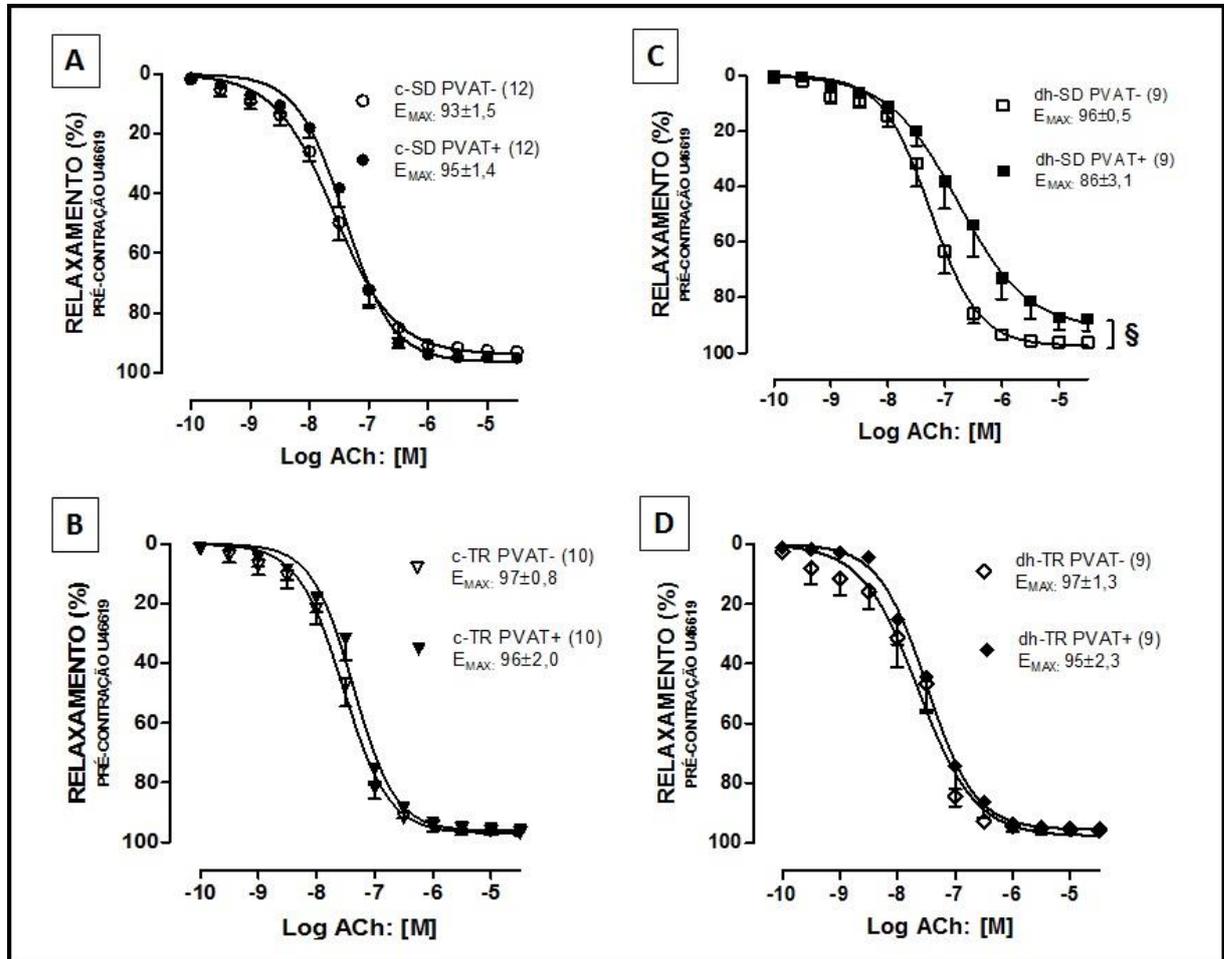


Figura 11: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, símbolos vazios) ou na presença (PVAT+, símbolos preenchidos) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). E_{MAX}: Resposta máxima. Valores expressos como média ± EPM. O número de animais (*n*) foi inserido em cada grupo. Test t de *Student*. §*p*<0,05 comparando a E_{MAX} das curvas PVAT- vs PVAT+ no mesmo grupo experimental.

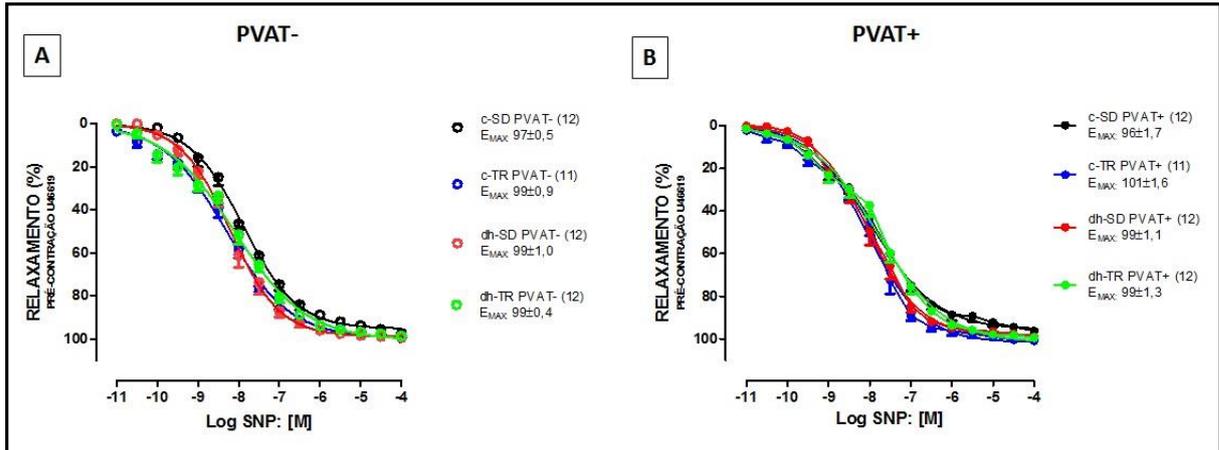


Figura 12: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, painel A) ou na presença (PVAT+, painel B) de tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias.

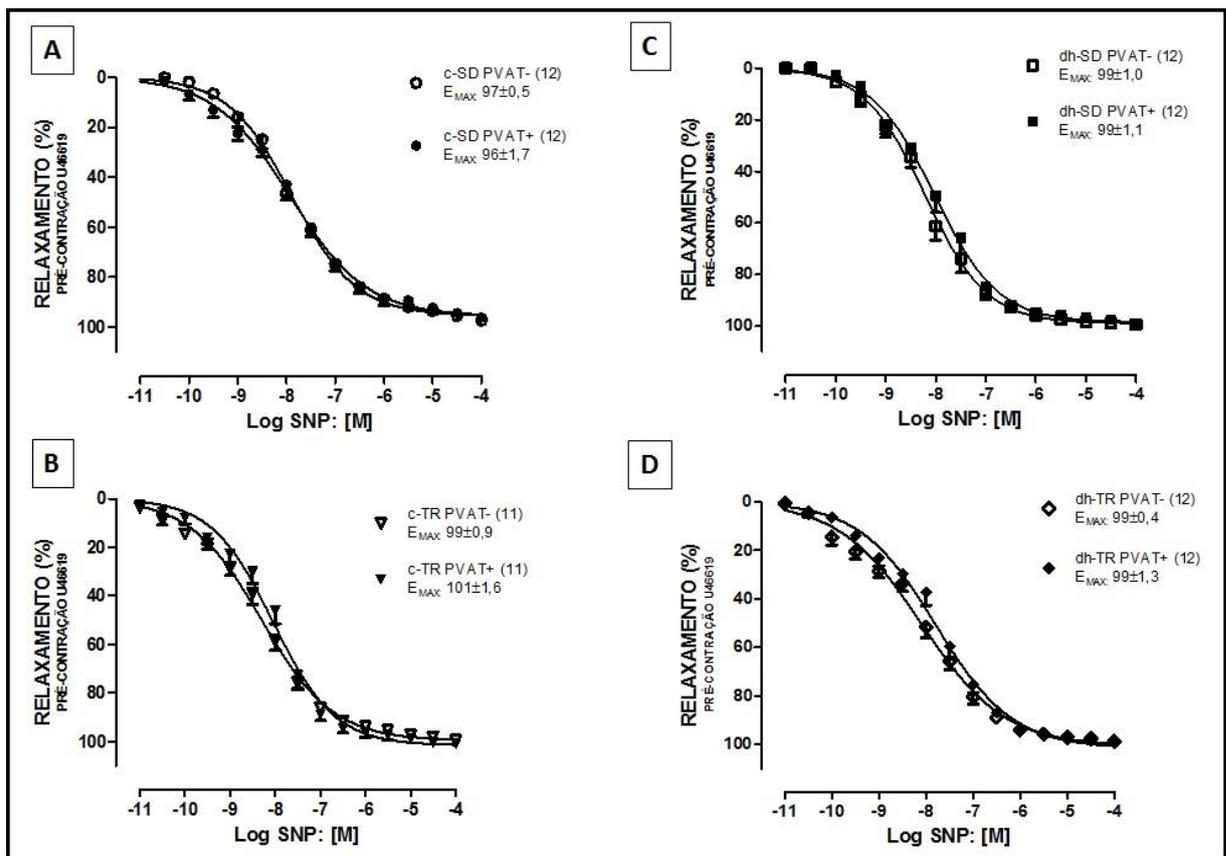


Figura 13: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, símbolos vazios) ou na presença (PVAT+, símbolos preenchidos) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-

TR, painel D). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. Test t de *Student*.

Os agonistas análogo do tromboxano A_2 (U46619, 100 pM – 3 μ M) e endotelina 1 (ET-1, 100 pM – 300 nM) produziram contração concentração-dependente em anéis de artéria femoral, com endotélio intacto, na ausência (PVAT-) e presença (PVAT+) de tecido adiposo perivascular.

Em resposta à ET-1, a presença do PVAT reduziu os valores de pEC_{50} em todos os grupos estudados, quando comparados aos respectivos anéis PVAT- (Tabela 3). Ainda, um significativo aumento da pEC_{50} nos anéis (PVAT- e PVAT+) do grupo c-TR foi observado em comparação ao grupo c-SD. Porém, nenhuma alteração na E_{MAX} em resposta à ET-1 foi observada em anéis de artéria femoral, tanto na comparação entre os grupos experimentais (Figura 14), quanto na comparação PVAT- vs PVAT+ dentro do mesmo grupo (Figura 15).

Tabela 3: Valores de potência (pEC_{50}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta ao análogo do tromboxano A_2 (U46619) e endotelina 1 (ET1) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD), controle treinado (c-TR) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

		GRUPOS - pEC_{50}			
		c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
ET-1	PVAT-	8,27 \pm 0,13	8,81 \pm 0,06*	8,45 \pm 0,10	8,72 \pm 0,13
	PVAT+	7,87 \pm 0,12 [§]	8,54 \pm 0,11 ^{§*}	8,00 \pm 0,08 [§]	8,28 \pm 0,14 [§]
U46619	PVAT-	8,09 \pm 0,11	8,16 \pm 0,19	8,27 \pm 0,18	8,18 \pm 0,14
	PVAT+	8,08 \pm 0,10	8,11 \pm 0,18	8,24 \pm 0,20	8,24 \pm 0,15

Valores de potência são representados como -log da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi entre 8 e 12. Test t de *Student*. [§] $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo PVAT-. ANOVA 2-vias. * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD.

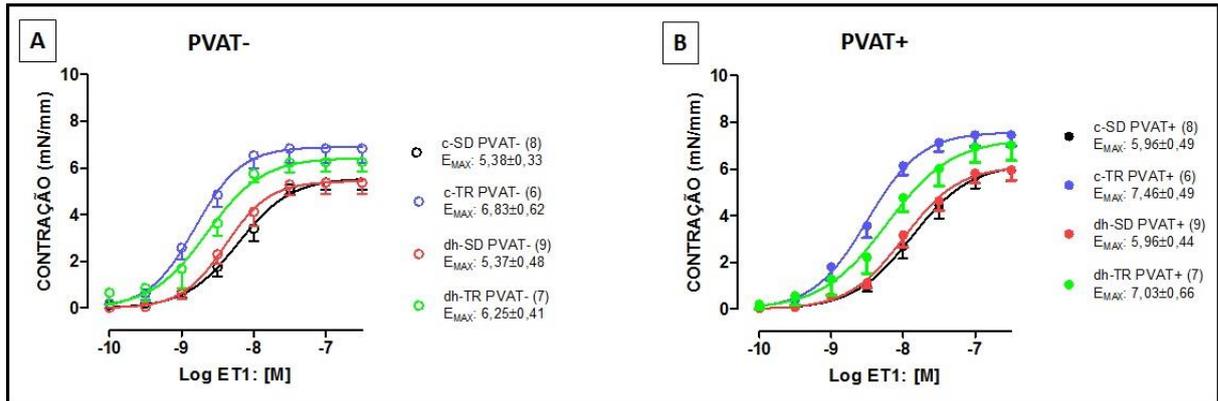


Figura 14: Curvas concentração-resposta à endotelina 1 (ET-1) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, painel A) ou na presença (PVAT+, painel B) de tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias.

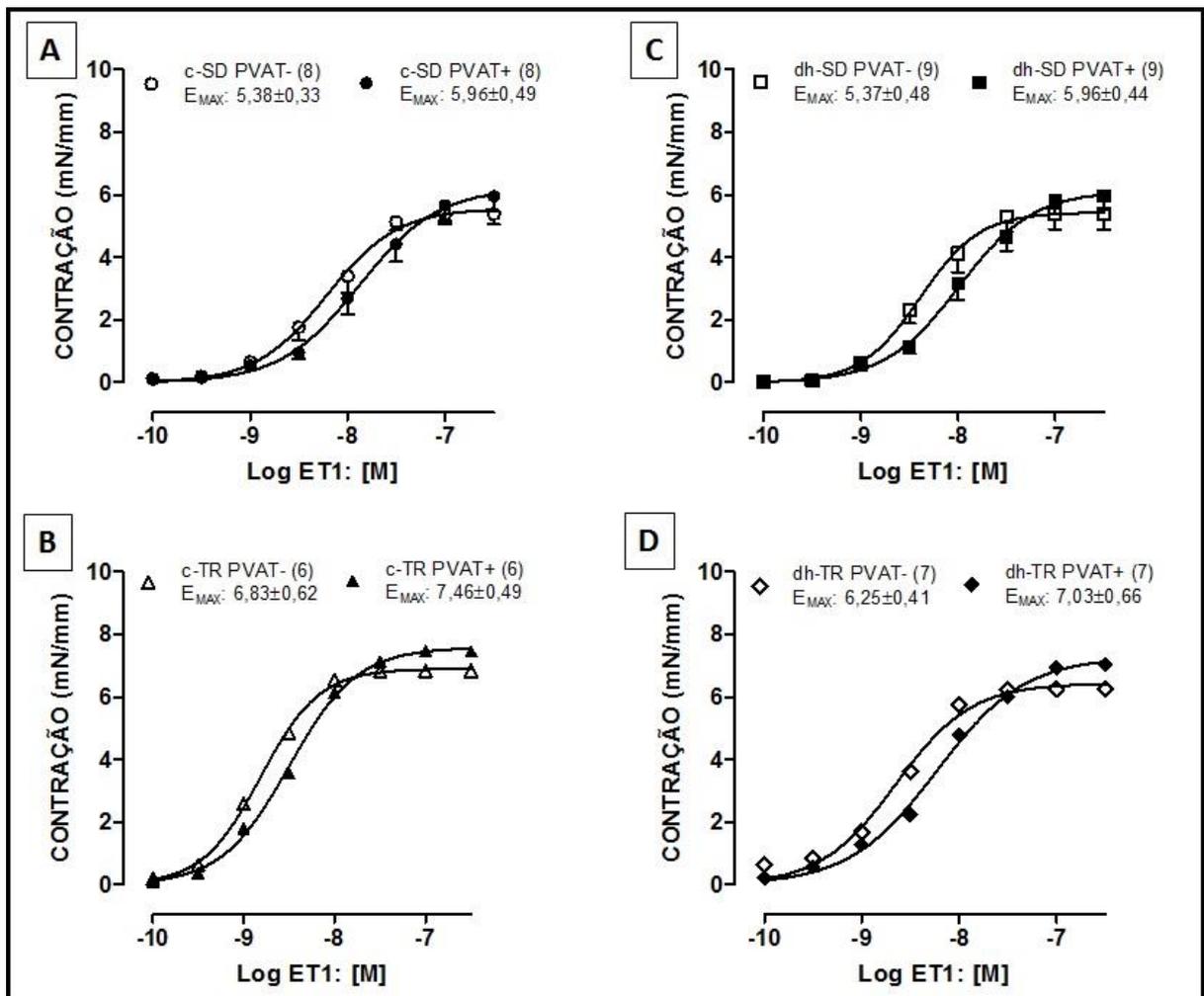


Figura 15: Curvas concentração-resposta à endotelina 1 (ET-1) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, símbolos vazios) ou na presença (PVAT+, símbolos

preenchidos) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. Test t de *Student*.

Em resposta ao agonista U46619, nenhuma alteração foi observada nos valores de pEC_{50} (Tabela 3) e E_{MAX} em anéis de artéria femoral, tanto na comparação entre os grupos experimentais (Figura 16), quanto na comparação PVAT- vs PVAT+ dentro do mesmo grupo (Figura 17).

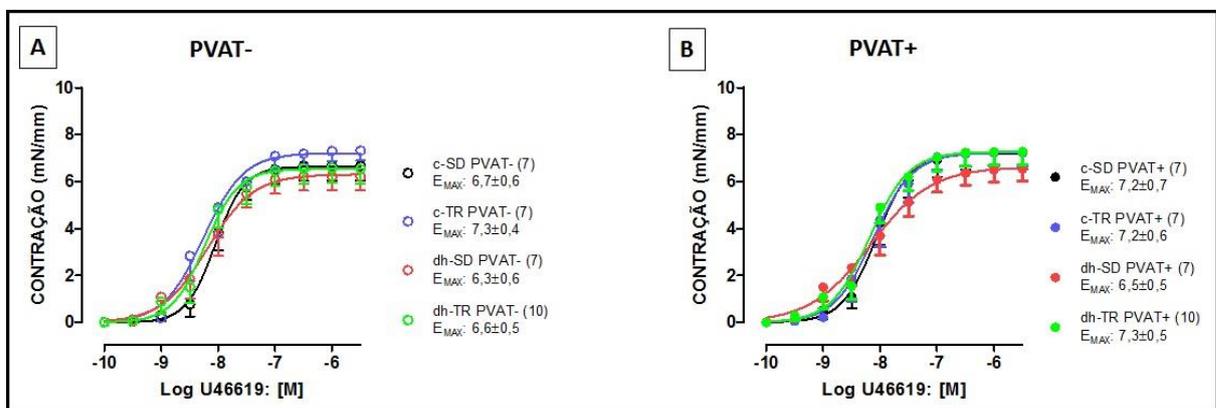


Figura 16: Curvas concentração-resposta ao análogo do tromboxano A2 (U46619) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, painel A) ou na presença (PVAT+, painel B) de tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias.

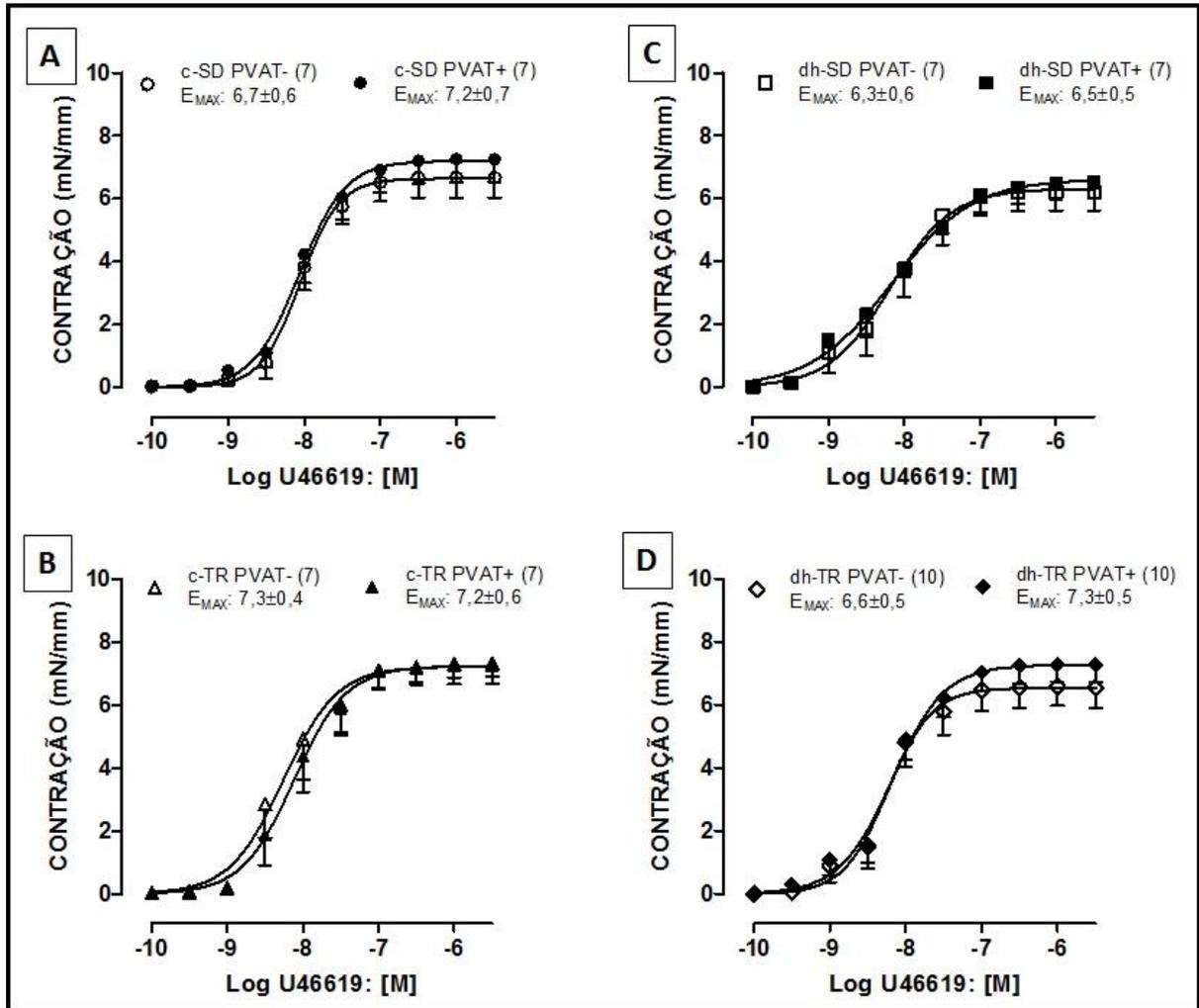


Figura 17: Curvas concentração-resposta ao análogo do tromboxano A2 (U46619) em anéis de artéria femoral na ausência (PVAT-, símbolos vazios) ou na presença (PVAT+, símbolos preenchidos) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (n) foi inserido em cada grupo. Test t de *Student*.

5.5 EXPRESSÃO PROTEICA EM ARTÉRIA FEMORAL (PVAT-)

Não observamos alteração na expressão proteica da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) em artéria femoral de todos os grupos (Figura 18, painel A). Porém, a expressão proteica da sintase endotelial do óxido nítrico fosforilada em serina 1177 (peNOS_{Ser1177}) reduziu significativamente em artéria femoral dos grupos dh-SD e dh-TR em comparação com os grupos controles (c-SD e c-TR) (Figura 18, painel B).

→ peNOS_{Ser1177} (dh-SD ↓74% vs c-SD) e (dh-TR ↓47% vs c-TR).

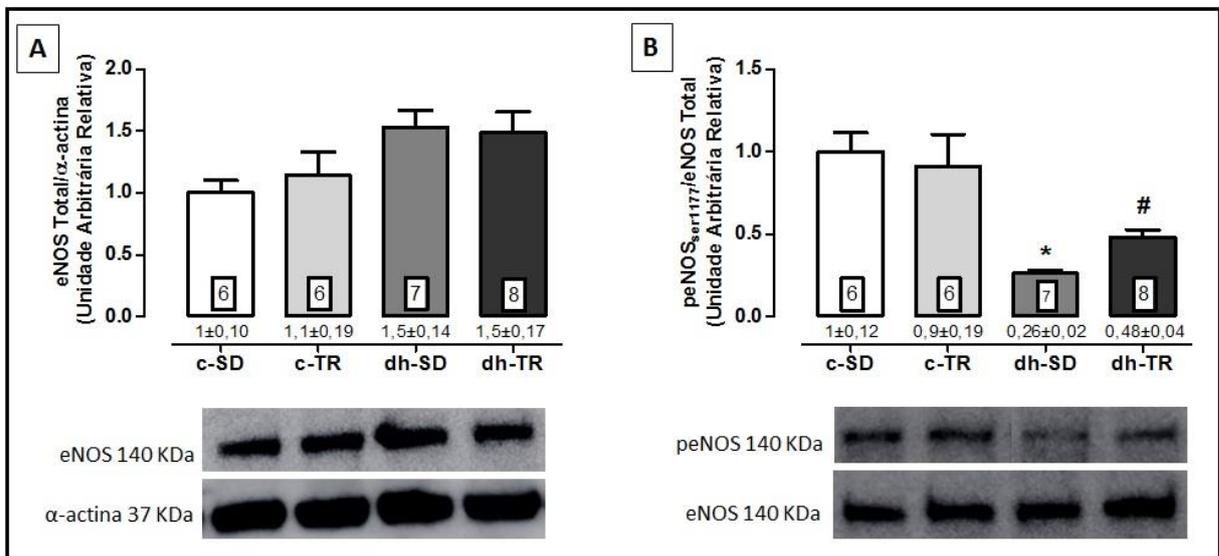


Figura 18: Expressão proteica de eNOS (painel A) e peNOS_{Ser1177} (painel B) em artéria femoral dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (*n*) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. **p*<0,05 comparado ao grupo c-SD. #*p*<0,05 comparado ao grupo c-TR.

5.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM ARTÉRIA FEMORAL (PVAT+)

Não observamos diferenças nos valores de NO basal em artéria femoral em todos os grupos estudados. Porém, após o estímulo com ACh (30 μ M) uma redução significativa na produção de NO no grupo dh-SD quando comparado ao grupo c-SD foi observada. O treinamento físico aeróbio foi efetivo em prevenir essa alteração no grupo dh-TR (Figura 19). Os dados apresentados foram quantificados apenas na artéria femoral, pois com a metodologia utilizada não observamos fluorescência no PVAT.

→ Produção de NO (dh-SD ↓**122%** vs c-SD) e (dh-TR ↑**65%** vs dh-SD).

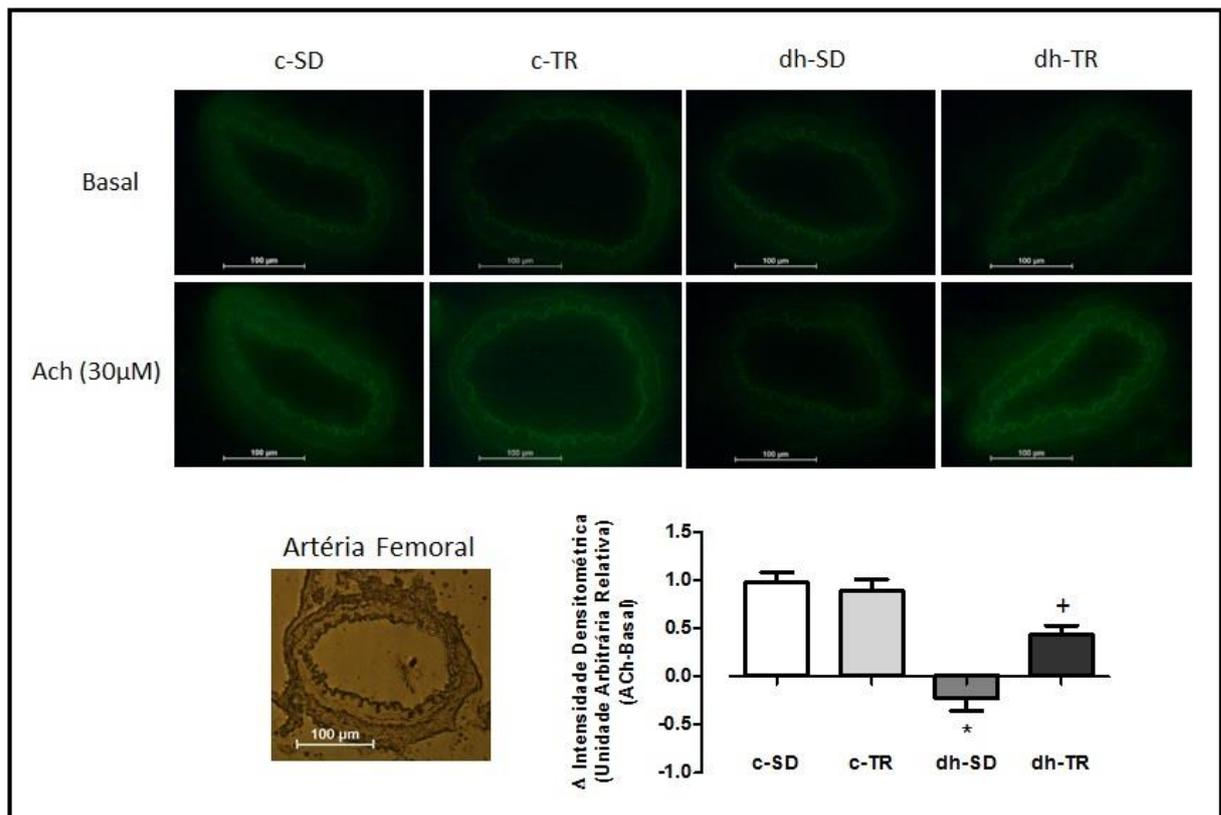


Figura 19: Figura representativa das imagens com marcador fluorescente de óxido nítrico em artéria femoral PVAT+ na condição basal e após estímulo com acetilcolina (ACh 30 μ M). Gráfico contendo a quantificação da produção de óxido nítrico (delta da ACh-basal) em artéria femoral PVAT+ de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média \pm EPM. O número de animais (*n*) foi entre 4 e 8. ANOVA 2- vias. * $p < 0,05$ comparado ao grupo c-SD. * $p < 0,05$ comparado ao grupo dh-SD.

5.7 GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) EM ARTÉRIA FEMORAL (PVAT+)

A geração de EROs aumentou no grupo dh-SD em amostras de artéria femoral PVAT+ quando comparado ao grupo c-SD e o treinamento físico aeróbio preveniu essa alteração no grupo dh-TR (Figura 20). Os dados apresentados foram quantificados na artéria femoral e no PVAT.

→ Geração de EROs (dh-SD ↑**50%** vs c-SD) e (dh-TR ↓**33%** vs dh-SD).

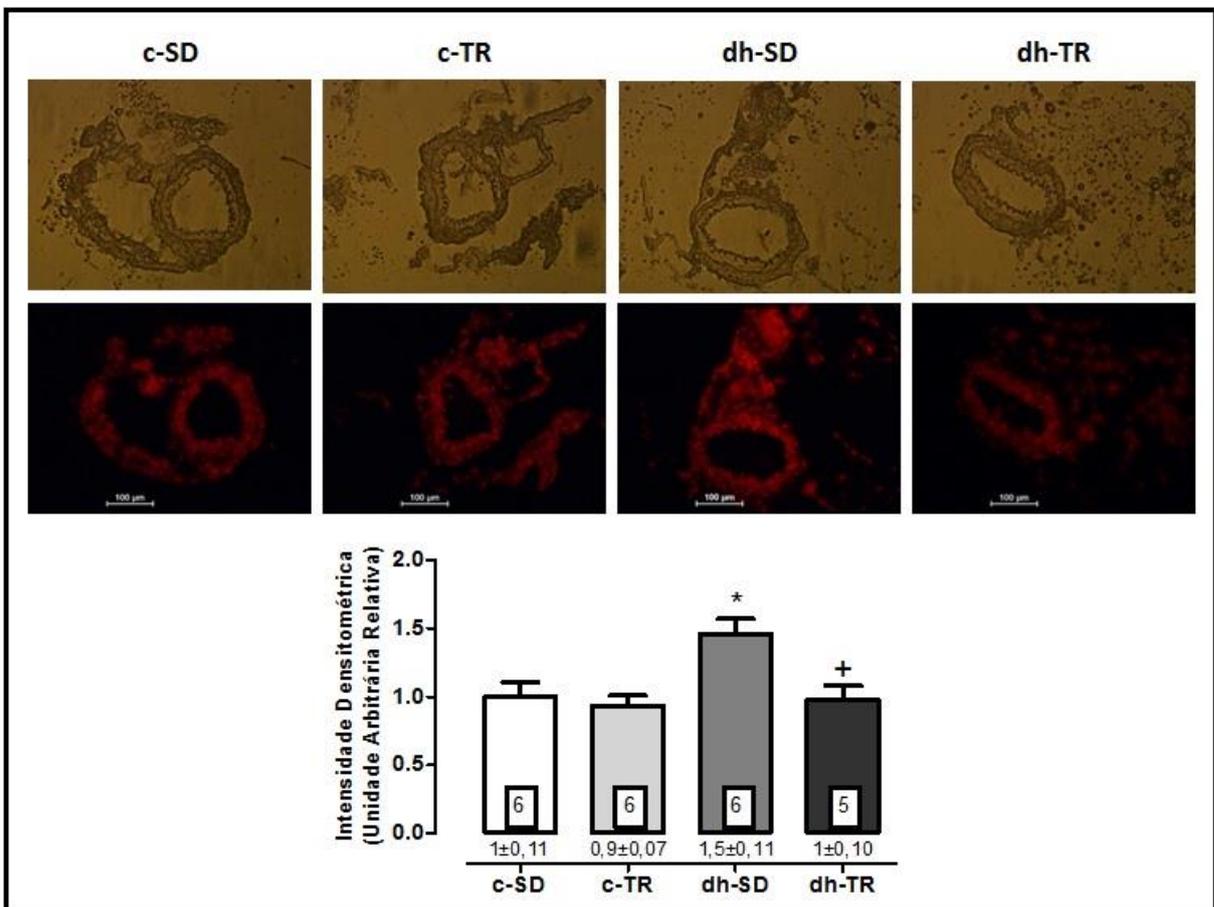


Figura 20: Figura representativa das imagens com marcador fluorescente à hidroetidina em artéria femoral PVAT+. Gráfico contendo a quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio em artéria femoral PVAT+ de camundongos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. O número de animais (*n*) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. **p*<0,05 comparado ao grupo c-SD. +*p*<0,05 comparado ao grupo dh-SD.

5.8 EXPRESSÃO PROTEICA EM ARTÉRIA FEMORAL E PVAT

Não observamos alteração na expressão proteica dos receptores de leptina (Ob-R), adiponectina (AdipoR1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α R1) em artéria femoral de todos os grupos experimentais (Figura 21, painéis A, B e C, respectivamente). No tecido adiposo perivascular (PVAT), a expressão proteica da leptina aumentou significativamente nos grupos dh-SD e dh-TR em comparação com os grupos controles (c-SD e c-TR) (Figura 21, painel D). Nenhuma diferença foi observada na expressão da proteína adiponectina em todos os grupos experimentais (Figura 21, painel E). Não foi possível avaliar a expressão da proteína fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no tecido adiposo perivascular da artéria femoral.

→ Leptina (dh-SD \uparrow **184%** vs c-SD) e (dh-TR \uparrow **127%** vs c-TR).

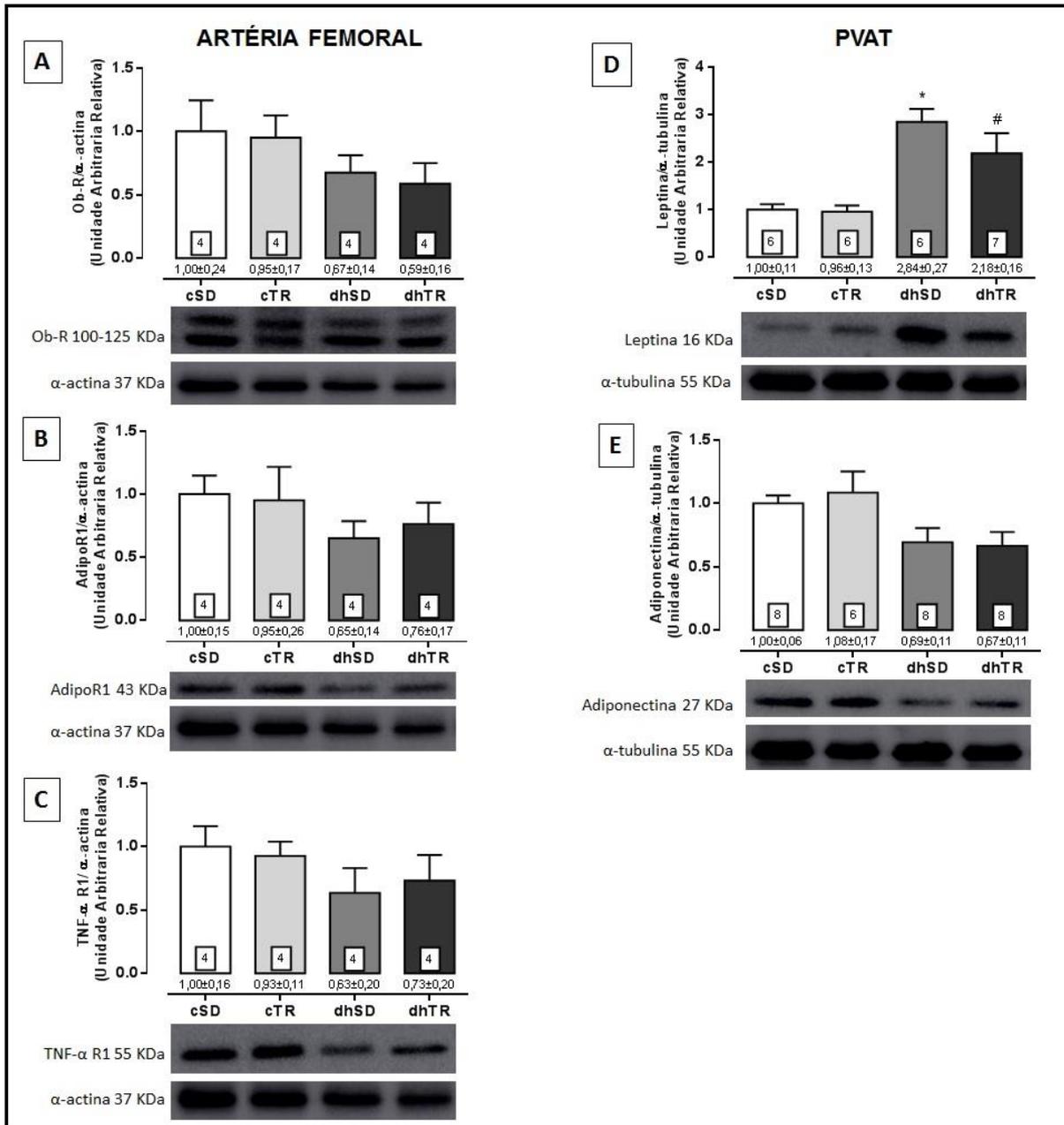


Figura 21: Expressão proteica em artéria femoral dos receptores de: leptina (Ob-R, painel A), adiponectina (AdipoR1, painel B) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α R1, painel C) e em tecido adiposo perivascular (PVAT): leptina (painel D) e adiponectina (painel E) dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. O número de animais (*n*) foi inserido em cada grupo. ANOVA 2-vias. **p*<0,05 comparado ao grupo c-SD. #*p*<0,05 comparado ao grupo c-TR.

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Principais resultados encontrados no estudo.

Grupos experimentais:

c-SD: controle sedentário;

c-TR: controle treinado

dh-SD: dieta hiperlipídica sedentário;

dh-TR: dieta hiperlipídica treinado

Sumário dos Resultados				
	c-TR vs c-SD	dh-SD vs c-SD	dh-TR vs dh-SD	dh-TR vs c-TR
Tempo de Exaustão	↑111%	↔	↑66%	↓20%
Distância de Exaustão	↑300%	↔	↑134%	↓36%
Velocidade de Exaustão	↑97%	↔	↑60%	↓19%
Peso Corporal	↔	↑59%	↔	↑54%
Gordura Epididimal	↔	↑265%	↔	↑355%
Glicemia	↔	↑62%	↔	↑32%
Colesterol Total	↔	↑184%	↔	↑139%
Triglicerídeos	↔	↑94%	↔	↑73%
Leptina	↔	↑10000%	↔	↑9186%
TNF- α	↔	↑173%	↓50%	↔
Função Vascular em Artéria Femoral	c-TR vs c-SD	dh-SD vs c-SD	dh-TR vs dh-SD	dh-TR vs c-TR
Relaxamento à ACh (PVAT-)	↔	↔	↔	↔
Relaxamento à ACh (PVAT+)	↔	E_{MAX} ↓10%	E_{MAX} ↑10%	↔
Relaxamento à SNP	↔	↔	↔	↔
Contração à ET-1 (PVAT- / PVAT+)	EC_{50} ↑10%	↔	↔	↔
Contração à U46619	↔	↔	↔	↔
Expressão Proteica em Artéria Femoral	c-TR vs c-SD	dh-SD vs c-SD	dh-TR vs dh-SD	dh-TR vs c-TR
eNOS total	↔	↔	↔	↔
peNOS _{Ser1177}	↔	↓74%	↔	↓47%
Ob-R	↔	↔	↔	↔

Expressão Proteica em Artéria Femoral	c-TR vs c-SD	dh-SD vs c-SD	dh-TR vs dh-SD	dh-TR vs c-TR
AdipoR1	↔	↔	↔	↔
TNF- α R1	↔	↔	↔	↔
Produção de NO (DAF-2)	↔	↓122%	↑65%	↔
Geração de EROs (DHE)	↔	↑50%	↓33%	↔
Tecido Adiposo Perivascular (PVAT)	c-TR vs c-SD	dh-SD vs c-SD	dh-TR vs dh-SD	dh-TR vs c-TR
Peso PVAT	↔	↑930%	↔	↑715%
Expressão Proteica Leptina	↔	↑184%	↔	↑127%
Expressão Proteica Adiponectina	↔	↔	↔	↔

Legenda: ↔sem alteração; ↑ aumento; ↓redução.

7 DISCUSSÃO

Foi demonstrado nesse estudo que a obesidade, induzida por dieta hiperlipídica por 16 semanas em camundongos, aumentou o peso e acúmulo de gordura corporal, inclusive do PVAT da artéria femoral, bem como as concentrações séricas de glicose, colesterol total, triglicerídeos, leptina e TNF- α . Na função vascular, nossos resultados indicam que a presença do PVAT, em artéria femoral dos animais obesos, reduz o relaxamento dependente do endotélio (Figura 11), sendo essa alteração acompanhada por aumento na geração de EROs (Figura 20) e redução na produção de NO vascular (Figura 19). O treinamento físico aeróbio de moderada intensidade foi eficaz em prevenir as alterações vasculares ocasionadas pela obesidade, independente de redução significativa das alterações metabólicas.

Já foi demonstrado que o modelo experimental de indução à obesidade pela ingestão de dieta hiperlipídica é eficaz em aumentar o peso e acúmulo de gordura corporal, bem como promover alterações metabólicas (CINTRA et al., 2008; PRADO et al., 2009), inflamatórias (VIRTANEN et al., 2002) e vasculares (DONATO et al., 2012). Na tentativa de prevenir/reverter essas alterações ocasionadas pela obesidade, recomenda-se a prática regular de exercício físico (OMS, 2010), uma eficaz terapia não farmacológica, conforme já demonstrado na literatura (LEE et al., 2016).

Alguns estudos envolvendo o modelo de obesidade em camundongos induzida por dieta hiperlipídica reportaram que o exercício físico aeróbio promove redução do peso e acúmulo de gordura corporal e melhora o perfil glicêmico e lipídico dos animais (BRADLEY, 2008; FARIAS et al., 2012; CINTRA et al., 2008; RAO et al., 2013). Porém, outros trabalhos demonstraram que o treinamento físico aeróbio não reduziu o peso corporal, gordura total, gordura visceral, colesterol total e triglicerídeos (BORG et al., 2012; KAWANISHI et al., 2013; SAMAN et al., 2014; SUGA et al., 2014). De forma semelhante, nosso estudo não verificou as respostas benéficas do treinamento físico na redução do peso e gordura corporal, bem como nos níveis circulantes de glicose, colesterol total, triglicerídeos e leptina.

Porém, verificamos nesse estudo que, o treinamento físico reduziu as concentrações circulantes de TNF- α nos animais induzidos à obesidade. Também em outros estudos foi demonstrado que o exercício físico pode modular a resposta anti-inflamatória independente de alterações na massa adiposa (PETERSEN et al.,

2005), podendo reduzir significativamente tanto a inflamação sistêmica como local (tecido adiposo) de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (VIEIRA et al., 2009). Tais benefícios podem ser mediados pelas miocinas secretadas pelo músculo esquelético em resposta ao exercício físico. Já foi demonstrado que elevações transitórias nos níveis de IL-6, provenientes dos músculos esqueléticos exercitados, atuam de forma anti-inflamatória estimulando a secreção de outras citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, antagonizando as ações de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α (PETERSEN et al., 2006).

Especificamente na função vascular sabe-se que o estímulo mecânico, promovido pela força de cisalhamento em resposta ao exercício físico, é um importante mediador das adaptações vasculares e desempenha papel fundamental na prevenção de disfunção endotelial e das doenças cardiovasculares (LAUGHLIN et al., 2008). Estudos realizados em cultura de células endoteliais sugerem que o aumento da frequência da força de cisalhamento pelo exercício físico, favorece o reparo ao dano de células endoteliais disfuncionais, pelo aumento da proliferação e angiogênese (ZHANG e FRIEDMAN, 2013) e ao mesmo tempo, o aumento da magnitude na força de cisalhamento suprime a inflamação e estresse oxidativo (ZHANG e FRIEDMAN, 2012).

Além disso, já foi demonstrado em estudos com humanos (ADAMS et al., 2005; ENNEZAT et al., 2001) e roedores (DURRANT et al., 2009; TOUATI et al., 2015; ZANCHI et al., 2008) que o exercício físico aumenta a expressão vascular de enzimas antioxidantes como a SOD, catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) e reduz a expressão e atividade da NAD(P)H oxidase e xantina oxidase. Dessa forma, adaptações vasculares na resposta antioxidante promovidas pelo exercício físico podem melhorar a função endotelial pela redução de EROs e consequente aumento na biodisponibilidade de NO (DURRANT et al., 2009; LESNIEWSKI et al., 2011; JENDZJOWSKY e DeLOREY, 2013; SCHEELE et al., 2009; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). No presente estudo, observamos que o exercício físico aeróbio foi eficaz em reduzir a geração de EROs, bem como aumentar a produção de NO em artéria femoral, na presença do tecido adiposo perivascular (PVAT+), e tais alterações foram associadas à normalização da função vascular.

A obesidade apresenta uma alta associação com resistência à insulina e eventos cardiovasculares (FUSTER et al., 2016) e, recentes estudos sugerem que, além da redução do peso e excesso de gordura corporal, a melhora no padrão de

secreção de adipocinas pelo tecido adiposo é fator determinante na prevenção e tratamento de doenças associadas à obesidade. Foi demonstrado que o treinamento físico pode reduzir o acúmulo de gordura corporal, incluindo os depósitos de PVAT, bem como promover adaptações metabólicas que modulam a expressão e secreção de adipocinas pelo tecido adiposo, reduzindo o estado pró-inflamatório observado na obesidade (LEE et al., 2016). Muitas dessas adaptações no tecido adiposo podem ocorrer independentes de grande redução do peso corporal. Dessa forma, estudos sugerem que tais efeitos do exercício físico, prevenindo e/ou atenuando a infiltração de células inflamatórias no tecido adiposo, é fator determinante na função vascular. No entanto, essas alterações em resposta ao exercício físico ainda não foram verificadas no PVAT (BOA et al., 2017).

O PVAT, localizado ao redor da maioria dos vasos sanguíneos, encontra-se ao exterior da camada adventícia vascular não possuindo nenhuma estrutura laminar ou barreira que os separe (PVAT e camada adventícia), podendo assim influenciar diretamente na função vascular (GAO et al., 2007). Já foi demonstrado, tanto em roedores como em humanos, que o PVAT apresenta células adiposas com características diferentes entre os leitos vasculares (BROWN et al., 2014; GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2016). O PVAT da aorta torácica apresenta, predominantemente, células similares as do tecido adiposo marrom, enquanto o PVAT da aorta abdominal é similar ao tecido adiposo branco (PADILLA et al., 2013). Também nas artérias periféricas de menor calibre, como as artérias carótida, mesentérica e femoral, o PVAT é predominantemente branco (BROWN et al., 2014; GOMEZ-HERNANDEZ et al., 2016).

Tem sido proposto que o *browning* do tecido adiposo poderia ser usado como uma terapia para distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares, associadas à obesidade. Para isso, novamente o exercício físico mostra-se uma efetiva terapia não farmacológica, capaz de estimular o *browning* do tecido adiposo por diferentes moléculas sinalizadoras (SEPA-KISHI et al., 2016). O exercício físico pode induzir ao *browning* por meio da ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e a liberação de catecolaminas, que se ligam aos seus receptores β 3-adrenérgicos no tecido adiposo, sinalizando para o aumento da expressão de UCP-1 e, conseqüente aumento do gasto energético por esse tecido (SANCHEZ-DELGADO et al., 2015). Além disso, as adaptações no músculo esquelético, em resposta ao treinamento físico, resultam na secreção de miocinas que induzem miogênese e

browning ao mesmo tempo em que aumentam o dispêndio energético (RODRIGUEZ et al., 2017). As miocinas conhecidas por induzirem o *browning* no tecido adiposo são a irisina (BOSTROM et al., 2012), a meteorina-*like* (METRNL) (RAO et al., 2014) e a interleucina-6 (IL-6) (KNUDSEN et al., 2014). Também, alguns metabólitos derivados do músculo esquelético em resposta ao exercício, como o lactato (CARRIERE et al., 2014) e o ácido β -aminoisobutírico (BAIBA) (ROBERTS et al., 2014), induzem ao *browning* no tecido adiposo.

Portanto, existem evidências de que o exercício físico promove a conversão do tecido adiposo branco em bege, contribuindo para o aumento do dispêndio energético, melhora do metabolismo de carboidratos e lipídios, maior resistência à inflamação e alteração no padrão de secreção por esse tecido (KAJIMURA et al., 2015), porém tais efeitos não são conhecidos no tecido adiposo perivascular. Assim, investigar se o *browning* do PVAT em leitos vasculares, predominantemente branco, pode ser estimulado pelo exercício físico, é uma estratégia interessante para prevenir e/ou tratar doenças vasculares associadas à obesidade.

Recente estudo desenvolvido em nosso grupo de pesquisa demonstrou que o treinamento físico aeróbio por 8 semanas em animais saudáveis promove significativos efeitos na morfologia e na quantidade de PVAT da aorta torácica de ratos, que foram associados com aumento na expressão das proteínas eNOS/pAMPK_{tre172}/mtTFA, sem alterações na resposta anticontrátil ou nas adipocinas secretadas pelo PVAT (ARAÚJO et al., 2015). Em modelos experimentais de obesidade, já foi demonstrado que o treinamento físico aeróbio melhora a função vascular prejudicada pela obesidade (SPONTON et al., 2017), no entanto, nenhum estudo investigou se essa modulação poderia estar sendo mediada pelo PVAT.

Os resultados encontrados nesse estudo sugerem uma modulação negativa do PVAT na função vascular da artéria femoral de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. A obesidade ocasionou um aumento significativo na massa do PVAT, bem como uma redução no relaxamento dependente do endotélio em artéria femoral, que foi associada à redução da produção de NO e aumento na geração de EROs. Por outro lado, o treinamento físico aeróbio foi eficaz em prevenir essas alterações vasculares, independente de redução da massa do PVAT.

Ainda não há consenso na literatura sobre os efeitos do PVAT no relaxamento vascular. Um estudo reportou redução do relaxamento dependente de endotélio em artéria mesentérica de ratos com síndrome metabólica (MENDIZÁBAL et al., 2013), enquanto outros estudos não evidenciaram redução do relaxamento na presença de PVAT, em aorta torácica de camundongos e artéria coronária de suínos (REIFENBERGER et al., 2007; BUNKER e LAUGHLIN, 2010; KETONEN et al., 2010).

A maioria dos estudos que avaliou o papel do PVAT na função vascular evidenciou sua função anticontrátil em aorta torácica de roedores. O estudo pioneiro que investigou o papel do PVAT na reatividade vascular de aorta torácica de ratos demonstrou redução da contração induzida pela norepinefrina, porém sem alterações ao cloreto de potássio e fenilefrina (SOLTIS e CASSIS, 1991). Posteriormente, estudos também realizados em aorta torácica de ratos demonstraram redução da contração à serotonina (GAO et al., 2007; DUBROVSKA et al., 2004; ARAUJO et al., 2015), angiotensina II e fenilefrina (LOHN et al., 2002; ARAUJO et al., 2015). Em trabalhos realizados com artéria mesentérica de camundongos, também demonstraram uma redução da contração à norepinefrina (LYNCH et al., 2013; WITHERS et al., 2014), serotonina, fenilefrina, porém sem alterações ao U46619 (VERLOHREN et al., 2004).

Nesse estudo, verificamos a resposta contrátil aos agentes U46619 e ET-1 em artéria femoral. O efeito anticontrátil do PVAT foi observado apenas em resposta à ET-1, constatado pela redução da pEC_{50} em todos os grupos experimentais, porém nenhuma alteração na E_{MAX} foi verificada, tanto em resposta à ET-1 como ao agente contrátil U46619. Outro estudo observou menor contração à ET-1 nos anéis PVAT+ (efeito anticontrátil) em artéria coronária de porcos sedentários e treinados, alimentados com dieta hiperlipídica, porém nenhuma alteração foi encontrada nos animais dos grupos controle (REIFENBERGER et al., 2007). O treinamento físico promoveu um aumento significativo da pEC_{50} em resposta à ET-1 nos animais do grupo controle (c-TR), tanto em anéis PVAT- como PVAT+ de artéria femoral. O oposto foi descrito por Bunker e Laughlin, que observaram, em artéria coronária de porcos, uma redução da contração (E_{MAX}) à ET-1 em resposta ao exercício físico em ambos os anéis pvat- e pvat+ dos animais controle (BUNKER e LAUGHLIN, 2010).

Assim, os resultados quanto ao efeito anticontrátil do PVAT ainda são controversos. Devem-se considerar os diferentes modelos de indução de obesidade, bem como o grau de disfunção metabólica dos animais. Alguns estudos, em que os animais apresentavam severa disfunção metabólica e exacerbado aumento do PVAT, a perda do efeito anticontrátil do PVAT foi demonstrada (MA et al., 2010; PAYNE et al., 2010). No entanto, os estudos que avaliaram o estágio inicial da obesidade, quando as alterações metabólicas são moderadas, verificaram um aumento da produção de NO pelo PVAT e melhora na função vascular como um mecanismo compensatório durante o desenvolvimento da obesidade (GIL-ORTEGA et al., 2010). Dessa forma, mais estudos investigando o papel do PVAT na função vascular em condições patológicas decorrentes da obesidade devem ser realizados.

Sabe-se que o papel regulatório do PVAT é diferente e específico para cada leito vascular, como demonstrado em recente estudo, que o efeito anticontrátil do PVAT na aorta torácica não é observado na aorta abdominal (VICTORIO et al., 2016). Os mecanismos envolvidos nessa diferença foram associados a menor expressão de eNOS e produção de NO no PVAT da aorta abdominal comparado ao PVAT da aorta torácica (VICTORIO et al., 2016). Assim, os estudos sugerem que a função do PVAT varia de acordo com o leito vascular estudado, com a característica do tecido adiposo presente no PVAT e também em qual espécie os efeitos do PVAT estão sendo avaliados.

Nesse estudo, a avaliação da expressão proteica da eNOS e peNOS_{ser1177} foi realizada na artéria femoral na ausência do tecido adiposo perivascular (PVAT-). Nenhuma alteração na expressão da eNOS total foi encontrada, enquanto uma significativa redução na expressão da peNOS_{ser1177} foi observada na artéria femoral dos camundongos obesos, e o treinamento físico não reverteu essa alteração. Portanto, a redução na produção de NO pelas células endoteliais na artéria femoral pode ter contribuído para o prejudicado relaxamento em resposta à ACh nos animais obesos. Contudo, na presença do tecido adiposo perivascular (PVAT+) em artéria femoral, verificamos um aumento na geração de EROs e redução na produção de NO nos camundongos obesos, que foi revertida pelo treinamento físico aeróbio. Esses resultados sugerem que a normalização da função vascular nos animais obesos treinados (dh-TR) pode ter sido mediada pelos efeitos benéficos do treinamento físico na função do PVAT da artéria femoral, uma vez que a expressão

proteica da peNOS_{ser1177} na artéria femoral (PVAT-) não foi diferente entre os grupos dh-SD e dh-TR.

Também a expressão proteica dos receptores de leptina (Ob-R), adiponectina (AdipoR1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α R1) foi avaliada na artéria femoral (PVAT-), sem qualquer diferença entre os grupos experimentais. Por outro lado, a expressão da leptina no PVAT, bem como seus níveis plasmáticos, apresentaram um aumento significativo nos animais alimentados com dieta hiperlipídica (dh-SD e dh-TR).

Alguns estudos reportaram que os efeitos vasodilatadores dependentes de NO induzidos pela leptina estão prejudicados em animais obesos induzidos por dieta hiperlipídica quando a hiperleptinemia é observada (BELTOWSKI et al., 2003; KORDA et al., 2008; XIANG et al., 2008). Quando administrada cronicamente em concentrações supra fisiológicas, exerce efeito potencialmente aterogênico, pelo aumento do recrutamento de monócitos (GRUEN, et al., 2007), secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (GUZIK et al., 2003; BELTOWSKI et al., 2006) e estresse oxidativo (PORRECA et al., 2004). Estudos afirmam que, cronicamente, a alta concentração de leptina leva ao aumento da formação de ânion superóxido (O_2^-) derivado de NAD(P)H oxidase e conseqüentemente redução da biodisponibilidade de NO (BELTOWSKI et al., 2005; KORDA et al., 2008). Sugere-se, portanto, que a hiperleptinemia pode induzir a disfunção endotelial pelo aumento na produção de EROs (BELTOWSKI et al., 2006; GRUEN et al., 2007; GUZIK et al., 2003; NORTHCOTT et al., 2012; PORRECA et al., 2004).

A partir disso, foi sugerido que na obesidade, a hiperleptinemia leva a um quadro de resistência periférica à leptina (KNIGHT et al., 2010; MYERS et al., 2008; MYERS et al., 2010). Já foi descrito na literatura que os níveis plasmáticos de leptina são inversamente correlacionados com a expressão gênica de seus receptores no núcleo arqueado do hipotálamo (YASARI et al., 2009). Embora poucos estudos tenham investigado os mecanismos envolvidos na resistência à leptina em tecidos periféricos, a redução na expressão de seus receptores foi observada nos rins de ratos (COATMELLECC-TAGLIONE et al., 2003) e cachorros obesos hiperleptinêmicos (GU et al., 2004), após indução por dieta hiperlipídica. Em células do músculo liso vascular de humanos foi demonstrado uma redução na expressão dos receptores de leptina depois de prolongada exposição à altas concentrações de leptina (50-100ng/ml) (BOHLEN, et al., 2007).

Nosso grupo demonstrou uma redução na expressão proteica do Ob-R na artéria femoral de ratos obesos hiperleptinêmicos, que foi reestabelecida nos animais treinados (SPONTON et al., 2017). Outros estudos demonstraram redução na expressão gênica dos receptores de leptina (Ob-R) no tecido adiposo branco de ratos alimentados com dieta rica em açúcar (DE QUEIROZ et al., 2014), bem como em fígado e músculo esquelético de ratos alimentados com dieta hiperlipídica (KANG et al., 2013). No entanto, alguns componentes da via de sinalização da leptina, após ativação de seu receptor, como STAT-3 e Akt, permaneceram inalterados na aorta de ratos obesos e hiperleptinêmicos (BELTOWSKI, et al., 2009). Dessa forma, embora alguns estudos tenham contribuído para a compreensão dos mecanismos que afetam os efeitos periféricos da leptina, muitas questões relacionadas à redução de seus receptores e dos componentes de sua via de sinalização intracelular no sistema vascular ainda precisam ser melhores investigadas.

Em relação à adiponectina, dentre os efeitos benéficos mediados por essa adipocina nos tecidos periféricos podemos citar: maior sensibilidade à insulina, aumento do gasto energético e homeostase vascular (CHENG et al., 2014; HUI et al., 2012). Nesse estudo, nenhuma alteração foi observada na expressão proteica de adiponectina no PVAT ou de seus receptores (AdipoR1) na artéria femoral de todos os grupos experimentais. Resultados similares foram descritos, sem alteração na expressão proteica de AdipoR1 na artéria femoral ou em níveis circulantes de roedores (SPONTON et al., 2017). Alguns estudos, em modelos de obesidade em roedores, reportaram redução na expressão gênica (CHANG et al., 2006; HUANG et al., 2006) e protéica dos receptores AdipoR1 no músculo esquelético (CHANG et al., 2006; FARIAS et al., 2012) e tecido adiposo branco, e ainda, dos receptores AdipoR2 no fígado (FARIAS et al., 2012). Também em estudo com humanos, verificaram redução na expressão gênica dos receptores AdipoR2 no tecido adiposo subcutâneo e uma redução ainda mais significativa no tecido adiposo visceral de indivíduos obesos (BLUHER et al., 2007). No entanto, somente um estudo avaliou a expressão dos receptores de adiponectina em vaso sanguíneo (artéria femoral – SPONTON et al., 2017). Dessa forma, futuros experimentos com objetivo de investigar o papel dos receptores de adiponectina e sua via de sinalização na reatividade vascular são necessários.

Está bem descrito na literatura que, inicialmente, a associação entre obesidade e inflamação foi proposta baseada no aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , em roedores e humanos obesos, verificando um prejuízo na sensibilidade à insulina (HOTAMISLIGIL et al., 1993). Posteriormente, verificou-se infiltração de macrófagos, em ratos e humanos obesos, sendo essas células a principal fonte de TNF- α (WEISBERG et al., 2003; CILDIR et al., 2013). Sabe-se que, em condições patológicas, como a obesidade, o PVAT secreta grande variedade de fatores pró-inflamatórios, como o TNF- α , contribuindo para um estado aterogênico (CHANG et al., 2013), ocasionando a disfunção vascular e, posteriormente, o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Verificamos nesse estudo, um aumento significativo nas concentrações circulantes de TNF- α nos animais sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica (dh-SD) e o treinamento físico aeróbio reverteu essa alteração no grupo dh-TR. No entanto, nenhuma diferença foi encontrada na expressão proteica de seu receptor (TNF- α R1) na artéria femoral.

A interação do TNF- α com seus receptores, TNF- α R1 e TNF- α R2, medeia a apoptose, lipólise, inibe a auto fosforilação do receptor de insulina, alterando assim o transporte de glicose (BLUHER et al., 2009; CILDIR et al., 2013; PALOMER et al., 2013). Além disso, reduz a lipase lipoproteica (LPL) e aumenta a expressão da lipase hormônio sensível (CILDIR et al., 2013), contribuindo para resistência à insulina na obesidade (WELLEN e HOTAMISLIGIL, 2005). Um estudo desenvolvido em obesos com resistência à insulina demonstrou que o tratamento farmacológico inibitório do TNF- α levou a melhora do estado inflamatório, porém não reverteu a resistência à insulina e a função endotelial (WASCHER et al., 2011). Recente estudo demonstrou que a produção de EROs no PVAT da aorta de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica foi mediada pelo TNF- α , resultando em aumento do tônus contrátil (DA COSTA et al., 2017; KETONEN et al., 2010). No entanto, os autores sugerem que a contribuição desses fatores para a progressão de um quadro aterosclerótico, por exemplo, precisa ser melhor investigada.

8 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a presença do PVAT reduziu o relaxamento dependente do endotélio em artéria femoral de camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica, associado com redução na produção de NO e aumento na geração de EROs teciduais, bem como significativas alterações metabólicas e pró-inflamatórias circulantes. O treinamento físico aeróbio preveniu as alterações vasculares, independente de reverter as alterações metabólicas ocasionadas pela obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

9 REFERÊNCIAS

- Adams V, Linke A, Krankel N, et al. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. **Circulation**. 2005;111:555-562.
- Aghamohammadzadeh R, Withers S, Lynch F, et al. Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target. **Br J Pharmacol**. 2012;165:670-682.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**. 2001;1:357(Pt 3):593-615.
- Araujo HN, Silva CPV, Sponton ACS, et al. Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. **Life Sciences**. 2015;125:79-87.
- Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, et al. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. **Circ Res**. 2005;28:97(9):864-71.
- Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. 2009;117(6):241-50.
- Boa BC, Yudkin JS, Van Hinsbergh VW, Bouskela E, Eringa EC. Exercise effects on perivascular adipose tissue: endocrine and paracrine determinants of vascular function. **Br J Pharmacol**. 2017 Feb 1. [Epub ahead of print]
- Borg ML, Omran SF, Weir J, Meikle PJ, Watt MJ. Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. **J Physiol**. 2012;590(17):4377-89.
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**. 2012;481: 463–468.
- Bradley RL, Jeon JY, Liu FF, et al. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2008;295(3):E586-94.
- Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**. 1978;45(6):1009-15.
- Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, Chen YE, Chang L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2014;34(8):1621-30.

Bunker AK, Laughlin MH. Influence of exercise and perivascular adipose tissue on coronary artery vasomotor function in a familial hypercholesterolemic porcine atherosclerosis model. **J Appl Physiol**. 2010;108:490-497.

Cao, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **J Endocrinol**. 2014;220:T47-T59.

Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, et al. Browning of white adipose cells by intermediate metabolites: an adaptive mechanism to alleviate redox pressure. **Diabetes**. 2014;63(10):3253-65.

Carvalho MHC, Fortes ZB, Tostes RC, et al. Funções normais do endotélio- Uma visão geral. In LUIZ, P.L.; LAURINDO FRM, CHAGAS ACP. **Endotélio e Doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, 2003. P 17-32.

Chang L, Milton H, Eitzman DT, Chen YE. Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension. **Cir J**. 2013;77(1):11-8.

Chen C, Jiang J, Lu JM, et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology**. 2010;299(1):H193-201.

Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **J Hepatol**. 2008;48(4):628-37.

Colaço LA, Passaglia RTA, Fortes ZB, Carvalho MHC. Biologia Vascular e Endotélio, In: KRIEGER, JE (editor). **Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares**. 1ª edição – São Paulo: Atheneu, 2008. P 331-386.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**. 2009;360:1509-1517.

Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, et al. Activation of human brown adipose tissue by a beta- adrenergic receptor agonist. **Cell Metabolism**. 2015;21(1):33-38.

Davel AP, Ceravolo GS, Wenceslau CF, Carvalho MH, Brum PC, Rossoni LV. Increased vascular contractility and oxidative stress in β_2 -adrenoceptor knockout mice: the role of NADPH oxidase. **J Vasc Res**. 2012;49:342-52.

Delbin MA, Davel AP, Couto GK, et al. Interaction between Advanced Glycation End Products Formation and Vascular Responses in Femoral and Coronary Arteries from Exercised Diabetic Rats. **PLoS One**. 2012;7:e53318.

Donato AJ, Henson GD, Morgan RG, et al. TNF- α impairs endothelial function in adipose tissue resistance arteries of mice with diet-induced obesity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2012;15:303(6):H672-9.

Dubrovaska G, Verlohren S, Luft FC, et al. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2004;286:H1107-H1113.

Durrant JR, Seals DR, Connell ML, et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and downregulation of NADPH oxidase. **J Physiol**. 2009;587:3271-3285.

Ennezat PV, Malendowicz SL, Testa M, et al. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. **J Am Coll Cardiol**. 2001;38(1):194-8.

Fang L, Zhao J, Chen Y, et al. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. **J Hypertens**. 2009;27(11):2174-2185.

Farias JM, Maggi RM, Tromm CB, et al. Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adiponectin/APPL1 protein levels in mice. **Lipids Health Dis**. 2012;10:11:134.

Fernández-Alfonso MS, Gil-Ortega M, García-Prieto CF, Aranguéz I, Ruiz-Gayo M, Somoza B. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **Int J Endocrinol**. 2013;2013:402053.

Fisher AB, Chien S, Barakat AI, et al. Endothelial cellular response to altered shear stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2001;281(3):L529-33.

Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and Perivascular Adipose Tissues and Their Influence on Cardiovascular Disease: Basic Mechanisms and Clinical Associations. **J Am Heart Assoc**. 2014;3:e000582.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 1980;288(5789):373-6.

Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, Walsh K. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. **Circ Res**. 2016;118:1786-1807.

Gálvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P, et al. Comparative expression analysis of the renin–angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. **J Endocrinol**. 2008;197:55-64.

Gao YJ, Lu C, Su LY, et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **British Journal of Pharmacology**. 2007;151:323-331.

Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular Effects of Exercise Training Molecular Mechanisms. **Circulation**, 2010;122(12):1221-38.

Gil-Ortega M, Condezo-Hoyos L, García-Prieto CF, Arribas SM, González MC, Arganguez I, Ruiz-Gayo M, Somoza B, Fernández-Alfonso MS. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates longterm high-fat diet-derived endothelial dysfunction. **PLoS One**. 2014; 9:95312.

Gil-Ortega M, Stucchi P, Guzmán-Ruiz R, et al. Adaptative nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. **Endocrinology**. 2010;151(7):3299-306.

Gollasch M, Dubrovská G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. **Trends Pharmacol Sci**. 2004;25(12):647-53.

Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. **Int J Endocrinol**. 2016; 2016:1216783.

Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. **Circulation**. 2009;119:1661-1670.

Guyton AC, Hall JE. Excitação e Contração do Músculo Liso, In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª edição – Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. P 95-103.

Haczeyni F, Barn V, Mridha AR, Yeh MM, Estevez E, Febbraio MA, et al. Exercise improves adipose function and inflammation and ameliorates fatty liver disease in obese diabetic mice. **Obesity (Silver Spring)**. 2015;23:1845-1855.

Hajer GR, Van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **Eur Heart J**. 29(24):2959-71, 2008.

Harper JA, Dickinson K, Brand MD. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. **Obes Rev**. 2001;2:255-265.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, et al. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **J Pharmacol Exp Ther**. 1988;244(1):181-9.

Jendzjowsky NG, Delorey DS. Short-term exercise training enhances functional sympatholysis through a nitric oxide-dependent mechanism. **J Physiol**. 2013;15;591(Pt 6):1535-49.

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. **Endocr Rev**. 2005;26(3):439-451.

Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. **Cell Metab**. 2015;22(4):546-59.

Kawanishi N, Mizokami T, Yano H, Suzuki K. Exercise attenuates M1 macrophages and CD8+ T cells in the adipose tissue of obese mice. **Med Sci Sports Exerc.** 2013;45:1684-1693.

Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. **Exerc Immunol Rev.** 2010;16:105-118.

Ketonen J, Shi J, Martonen E, et al. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. **Circ J.** 2010;74:1479-1487.

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, et al. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. **Circulation.** 2006;113(15):1888-904.

Knudsen JG, Bertholdt L, Joensen E, Lassen SB, Hidalgo J, Pilegaard H. Skeletal muscle interleukin-6 regulates metabolic factors in iWAT during HFD and exercise training. **Obesity (Silver Spring).** 2015;23:1616-1624.

Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawaharas S, Kirino Y, Nagoshi H, et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diamino fluoresceins. **Anal Chem.** 1998;70:2446-2453.

Kranendonk ME, Van Herwaarden JA, Stupkova T, De Jager W, Vink A, Moll FL, et al. Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: distinct fat depots and vascular risk factors. **Atherosclerosis.** 2015;239:419-427.

Laughlin MH, Newcomer SC, Bender SB. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. **J Appl Physiol.** 2008;104(3):588-600.

Lee S, Norheim F, Langleite TM, Noreng HJ, Storås TH, Afman LA, et al. Effect of energy restriction and physical exercise intervention on phenotypic flexibility as examined by transcriptomics analyses of mRNA from adipose tissue and whole body magnetic resonance imaging. **Physiol Rep.** 2016;4:e13019.

Lesniewski LA, Durrant JR, Connell ML, et al. Aerobic exercise reverses arterial inflammation with aging in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2011;301:H1025-H1032.

Li C, Wang Z, Wang C, et al. Perivascular Adipose Tissue-Derived Adiponectin Inhibits Collar-Induced Carotid Atherosclerosis by Promoting Macrophage Autophagy. **PLoS ONE.** 2015;10(5):e0124031.

Li YF, LaCroix C, Freeling J. Specific subtypes of nicotinic cholinergic receptors involved in sympathetic and parasympathetic cardiovascular responses. **Neuroscience Letters.** 2009;462(1):20-23.

Lohn M, Dubrovská G, Lauterbach B, et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **FASEB J**. 2002;16:1057-63.

Lynch FM, Withers SB, Yao Z, Werner ME, Edwards G, Weston AH, et al. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2013;15:304(6):H786-95.

Ma L, Ma S, He H, Yang D, Chen X, Luo Z, et al. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Hypertens Res**. 2010;33(5):446-53.

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;33(2):225-31.

Malnick S, Knobler H. The medical complications of obesity. **Qjm**. 2006;99:565-579.

Mathieu P, Lemieux I, Despres JP. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**. 2010;87(4):407-416.

Mendizábal Y, Llorens S, Nava E. Vasoactive effects of prostaglandins from the perivascular fat of mesenteric resistance arteries in WKY and SHROB rats. **Life Sci**. 2013;93(25-26):1023-32.

Mohamed F, Monge JC, Gordon A, et al. Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor- α . **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 1995;15(1):52-7.

Mohammed MM, Myers DS, Sofola OA, Hainsworth R, Drinkhill MJ. Vasodilator effects of leptin on canine isolated mesenteric arteries and veins. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2007;34(8):771-4.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**. 1991;43(2):109-42.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res**. 1977;41(1):19-26.

Nakagawa K, Higashi Y, Sasaki S, et al. Leptin causes vasodilation in humans. **Hypertens Res**. 2002;25(2):161-5.

Northcott JM, Yeganeh A, Taylor CG, et al. Adipokines and the cardiovascular system: mechanisms mediating health and disease. **Can J Physiol Pharmacol**. 2012;90(8):1029-59.

ORGANIZAÇÃO MUNDAL DE SAÚDE. Global recommendations on physical activity for healthy. World Health Organization. Geneva, out. 2010

Ozen G, Daci A, Norel X, Topal G. Human perivascular adipose tissue dysfunction as a cause of vascular disease: focus on vascular tone and wall remodeling. **European Journal of Pharmacology**. 2015;766:16-24.

Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 2013;304:R543–R552.

Payne GA, Borbouse L, Kumar S, Neeb Z, Alloosh M, Sturek M, et al. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-beta pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2010;30(9):1711-7.

Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol.** 2005;98(4):1154-1162.

Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. **Cardiovasc Res.** 2003;57:456-467.

Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. **J Clin Endocrinol Metab.** 2004;89(2):447-52.

Police SB, Tatcher SE, Charnigo R, Daugherty A, Cassis LA. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin ii-induced abdominal aortic aneurysm formation. **Arteriosclerosis, Trombosis, and Vascular Biology.** 2009;29(10):1458-1464.

Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. Obesity and inflammatory adipokines: practical implications for exercise prescription. **Rev Bras Med Esporte.** 2009;15(5):378-383.

Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. **Curr Diab Rep.** 2005;5(4):260-6.

Rajsheker S, Manka D, Blomkalns AL, et al. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. **Curr Opin Pharmacol.** 2010;10(2):191-6.

Rao X, Zhong J, Xu X, Jordan B, Maurya S, Braunstein Z, et al. Exercise protects against diet-induced insulin resistance through downregulation of protein kinase C β in mice. **PLoS One.** 2013;8(12):e81364.

Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, et al. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. **Cell.** 2014;157:1279-1291.

Rask-Madsen C, Domínguez H, Ihlemann N, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin's stimulating effect on glucose uptake and endothelium-dependent vasodilation in humans. **Circulation.** 2003;14:108(15):1815-21.

- Reifenberger MS, Turk JR, Newcomer SC, et al. Perivascular fat alters reactivity of coronary artery: effects of diet and exercise. **Med Sci Sports Exerc.** 2007;39:2125-2134.
- Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, Schinzel RT, Lewis GD, Dejam A, et al. β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors. **Cell Metab.** 2014;19(1):96-108.
- Rodriguez A, Becerril S, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Fruhbeck G. Cross-talk between adipokines and myokines in fat browning. **Acta Physiologica.** 2017;219(2):362-381.
- Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. **Cell.** 2014;156(1-2):20-44.
- Sahin AS, Bariskaner H. The mechanisms of vasorelaxant effect of leptin on isolated rabbit aorta. **Fundam Clin Pharmacol.** 2007;21(6):595-600.
- Samaan MC, Marcinko K, Sikkema S, Fullerton MD, Ziafazeli T, Khan MI, et al. Endurance interval training in obese mice reduces muscle inflammation and macrophage content independently of weight loss. **Physiol Rep.** 2014;2(5).
- Sanchez-Delgado G, Martinez-Tellez B, Olza J, Aguilera CM, Gil A, Ruiz JR. Role of exercise in the activation of brown adipose tissue. **Ann Nutr Metab.** 2015;67:21-32.
- Scheele C, Nielsen S, Pedersen BK. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. **Trends Endocrinol Metab.** 2009;20:95-99.
- Schinzari F, Tesauro M, Rovella V, et al. Generalized impairment of vasodilator reactivity during hyperinsulinemia in patients with obesity-related metabolic syndrome. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2010;299(6):E947-52.
- Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte.** 2004;10(4):314-318.
- Sepa-Kishi DM, Ceddia RB. Exercise-mediated effects on white and brown adipose tissue plasticity and metabolism. **Exercise and Sport Sciences Reviews.** 2016;44(1):37-44.
- Shyy JYJ, Chien S. Role of Integrins in Endothelial Mechanosensing of Shear Stress. **Circulation Research.** 2002;91(9):769-75.
- Silva JC, Cesar FA, de Oliveira EM, et al. New PPAR- γ partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Pharmacological Research.** 2016;104:49-60.
- Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clin. Exp. Hypertens.** 1991;A13:277-296.

Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. **Nature**. 2008;5;453(7196):783-7.

Sponton AC, Silva FH, Araujo HN, Valgas da Silva CP, de Moraes C, Antunes E, Zanesco A, Delbin MA. Circulating Concentrations of Adipocytokines and Their Receptors in the Isolated Corpus Cavernosum and Femoral Artery from Trained Rats on a High-Fat Diet. **J Vasc Res**. 2017;54(1):33-50.

Suga T, Kinugawa S, Takada S, Kadoguchi T, Fukushima A, Homma T, et al. Combination of exercise training and diet restriction normalizes limited exercise capacity and impaired skeletal muscle function in diet-induced diabetic mice. **Endocrinology**. 2014;155(1):68-80.

Szasz T, Webb C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clinical Science**. 2012;122:1-12.

Touati S, Montezano AC, Meziri F, et al. Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, ERK1/2 and SAPK/JNK downregulation in obese rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 2015;42(2):179-85.

Van Rossum JM. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. 1963;143:299-330.

Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium: vasoactive mediators. **Prog Cardiovasc Dis**. 1996;39(3):229-38.

Vasconcelos LABA, Carvalho HF. Célula muscular lisa. In: **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Org: Carvalho HF e Collares-Buzato CB. São Paulo: Manole, 2005. P 68-82.

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

Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, et al. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2009;296(5):E1164-71.

Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2005;288(3):H1016-21.

Virtanen KA, Lönnroth P, Parkkola R, et al. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in non obese and obese humans. **J Clin Endocrinol Metab**. 2002;87(8):3902-10.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**. 2009;360:1518-1525.

Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension. **Hypertension**. 2008;51(1):8-14.

Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**. 2003;27(1-4):201-6.

Withers SB, Simpson L, Fattah S, Werner ME, Heagerty AM. cGMP-dependent protein kinase (PKG) mediates the anticontractile capacity of perivascular adipose tissue. **Cardiovasc Res**. 2014;101(1):130-7

Woodman CR, Thompsom MA, Turk JR, et al. Endurance exercise training improves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hypercholesterolemic male pigs. **J Appl Physiol**. 2005;99(4):1412-21.

Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell**. 2012;150:366-376.

Xue Y, Xu X, Zhang XQ, Farokhzad OC, Langer R. Preventing diet-induced obesity in mice by adipose tissue transformation and angiogenesis using targeted nanoparticles. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2016;113:5552-5557.

Yen M, Ewald MB. Toxicity of weight loss agents. **Journal of Medical Toxicology**. 2012;8(2):145-152.

Yudkin JS, Eringa E, Stehouwer CD. Vasocrine signaling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. **Lancet**. 2005;365:1817-1820.

Zanchi NE, Bechara LRG, Tanaka LY, et al. Moderate exercise training decreases aortic superoxide production in myocardial infarcted rats. **Eur J Appl Physiol**. 2008;104(6):1045-52.

Zanesco A, Antunes E. Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches. **Pharmacol Ther**. 2007;114(3):307-17.

Zhang J, Friedman MH. Adaptive response of vascular endothelial cells to an acute increase in shear stress magnitude. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2012;15:302(4):H983-91.

Zhang J, Friedman MH. Adaptive response of vascular endothelial cells to an acute increase in shear stress frequency. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2013;15:305(6):H894-902.

10 ANEXO

10.1 Anexo A – Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM ARTÉRIA FEMORAL DE CAMUNDONGOS TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**, registrada com o nº **4280-1**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Maria Andréia Delbin e Amanda Christine da Silva Sponton**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.898, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 21 de junho de 2016.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/06/2016-01/03/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	21/06/2016-01/03/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Isogênico / C57BL6/JUnib
No. de animais:	80
Peso / Idade:	28 dias / 20g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 21 de junho de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

10.2 Anexo B – Alteração de título do projeto no Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/Unicamp

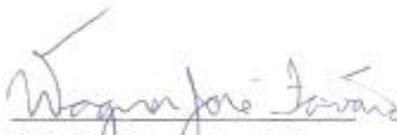
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM ARTÉRIA FEMORAL DE CAMUNDONGOS TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **4260-1**), de responsabilidade da **Profa. Dra. Maria Andréia Delbin e Amanda Christine da Silva Sponton**, teve o título alterado para **Avaliação da reatividade vascular da artéria femoral na presença do tecido adiposo perivascular em camundongos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica (anterior:**

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 21/06/2016.

Campinas, 25 de janeiro de 2017.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13063-870 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisb@unicamp.br
<http://www.lb.unicamp.br/ceea/>

10.3 Anexo C – Declaração de Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DA ARTÉRIA FEMORAL, NA PRESENÇA DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR, EM CAMUNDONGOS TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 15 de agosto de 2018

Assinatura: 

Nome do(a) autor(a): **Amanda Christine da Silva Sponton**
RG n.º 30.479.631-1

Assinatura: 

Nome do(a) orientador(a): **Maria Andréia Delbin**
RG n.º 27.697.202-08