



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Daniela Esteves Ferreira dos Reis Costa

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES ASSOCIADAS À OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA DE CAFETERIA E O PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR
(PVAT)**

Belo Horizonte

2021

Daniela Esteves Ferreira dos Reis Costa

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES ASSOCIADAS À OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA DE CAFETERIA E O PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR
(PVAT)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniella Bonaventura

Belo Horizonte

2021

043

Costa, Daniela Esteves Ferreira dos Reis.

Alterações cardiovasculares associadas à obesidade induzida por dieta de cafeteria e o papel do tecido adiposo perivascular (PVAT) [manuscrito] / Daniela Esteves Ferreira dos Reis Costa. - 2021.

116 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniella Bonaventura.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia e Farmacologia. 2. Obesidade. 3. Sistema Cardiovascular. 4. Leptina. 5. Óxido Nítrico. 6. Sistema Renina-Angiotensina. 7. Ciclo-Oxigenase 1. 8. Tecido Adiposo. I. Bonaventura, Daniella. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 335 DE DANIELA ESTEVES FERREIRA DOS REIS COSTA

"Alterações Cardiovasculares Associadas à Obesidade Induzida por Dieta de Cafeteria e o Papel do Tecido Adiposo Perivascular (PVAT)"

DANIELA ESTEVES FERREIRA DOS REIS COSTA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **03 de maio de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni, ICB/Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Graziela Scialanti Ceravolo, CCB/Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Rafael Menezes da Costa, CISAU/Universidade Federal de Goiás - Regional Jataí

Prof. Dr. Steyner de França Côrtes, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Daniella Bonaventura, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientadora

Belo Horizonte, 3 de maio de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Menezes da Costa, Usuário Externo**, em 04/05/2021, às 09:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Venturini Rossoni, Usuário Externo**, em 04/05/2021, às 09:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Steyner de Franca Cortes, Professor do Magistério Superior**, em 04/05/2021, às 10:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Graziela Sciantti Ceravolo, Usuário Externo**, em 04/05/2021, às 12:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 04/05/2021, às 13:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0677950** e o código CRC **9120A280**.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e por iluminar e guiar os meus passos, dando-me saúde, coragem, perseverança e resiliência durante essa caminhada para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos.

À minha família, em especial à minha mãe, Sandra Reis, a quem eu agradeço por ser minha fonte inesgotável de amor, sabedoria e inspiração. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos mais felizes e mais difíceis dessa trajetória e de todas as outras, sempre me apoiando e me incentivando, comemorando e aplaudindo cada conquista e não me deixando desistir diante dos mais temidos desafios, me fazendo enxergar o quanto sou capaz de enfrentá-los e superá-los para me tornar cada vez mais forte.

Ao meu amor e parceiro, Gabriel Godinho, agradeço por despertar o melhor mim e ser meu grande exemplo de dedicação e trabalho árduo para colher bons frutos ao longo dessa caminhada. Obrigada por me impulsionar para que eu alcance realizações e sucesso no meu futuro profissional, por me encorajar a ir em busca dos meus sonhos e o mais importante, por sonhar junto comigo.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais pela valiosa oportunidade de fazer parte de seu corpo discente durante o Mestrado e Doutorado.

Agradeço aos professores da Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, os quais tive a oportunidade de cursar disciplinas fundamentais para a minha formação e aprender com o vasto conhecimento de cada um deles.

À minha orientadora e “mãe científica”, professora Daniella Bonaventura, agradeço imensamente por abrir as portas do Laboratório de Farmacologia Vascular e permitir que eu fizesse parte dessa “família científica” tão especial com a qual eu dividi a maior parte dos meus dias durante essa trajetória. Obrigada pela mentoria ao longo de todos esses anos, dividindo conosco sua bagagem de conhecimento e experiência acadêmica e científica que certamente me sentirei honrada em poder repassar adiante em meu futuro profissional.

Às queridas amigas e “irmãs científicas” que a Pós-Graduação me presenteou, Natália Araújo, Natália Nóbrega e Naiara Assis, o meu eterno muito obrigada. *“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”* Levarei comigo um pouco do que aprendi com cada uma de vocês e uma enorme saudade de todos os momentos que compartilhamos. Agradeço por dividirem comigo não apenas a bancada de experimentos, mas as experiências de vida, tornando essa trajetória infinitamente mais leve, divertida e prazerosa. Juntas somos mais fortes e alçamos voos cada vez mais altos.

Aos professores colaboradores Adaliene Ferreira, Jader Cruz, Stéfany Cau, Sílvia Guatimosim e Luciano Capettini, agradeço por aceitarem participar da realização desse trabalho e pela valiosa contribuição e parceria.

Aos colegas colaboradores Amanda Oliveira, Artur Miranda, Alexandre Bruno e Sérgio Scalzo, agradeço por todo o conhecimento compartilhado durante os experimentos em colaboração e pela constante disponibilidade e dedicação.

Ao professor Steyner Côrtes, agradeço por me auxiliar na escolha certa de um supervisor no Canadá reconhecido internacionalmente como especialista na área de mecanismos vasculares e doenças cardiovasculares para a realização do estágio doutoral no exterior.

Aos professores Éric Thorin, Nathalie Trescases e toda a sua equipe de laboratório do Institut de Cardiologie de Montréal da Université de Montréal - Canadá, agradeço pela valiosa e inesquecível oportunidade de realização do estágio doutoral no exterior e pela imensurável contribuição na minha formação científica.

Aos animais utilizados nos protocolos experimentais para o desenvolvimento do presente estudo, minha eterna gratidão e respeito.

Aos professores Luciana Rossoni, Graziela Ceravolo, Rafael Costa e Steyner Côrtes, agradeço por aceitarem compor a banca examinadora, enriquecendo a discussão dos achados desse estudo.

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Vascular (LFV) do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o suporte financeiro das agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

A obesidade está entre as causas mais importantes de doenças cardiovasculares. O tecido adiposo perivascular (PVAT) exerce importante influência sobre os vasos sanguíneos, podendo se relacionar a progressão ou regressão de doenças cardiovasculares relacionadas à obesidade. Sabendo-se que a dieta de cafeteria (dieta CAF) reflete a variedade de alimentos altamente calóricos e de fácil acesso nas sociedades ocidentais, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade e desordens metabólicas, o objetivo desse trabalho foi avaliar o impacto da dieta CAF no sistema cardiovascular, bem como sua influência no perfil vasoativo do PVAT. Os resultados encontrados mostraram que a dieta CAF induziu aumento do peso corporal e do índice de adiposidade, hiperlipidemia, hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência à insulina. A análise do eletrocardiograma e da função cardíaca demonstrou que a dieta CAF promoveu atraso na condução atrioventricular e aumento na contratilidade/relaxamento basal do ventrículo esquerdo. O mesmo resultado foi observado a nível celular, em que a dieta CAF exacerbou a resposta de contração/relaxamento de cardiomiócitos. Entretanto, frente ao estresse farmacológico com isoprenalina, a contratilidade/relaxamento do ventrículo esquerdo no grupo CAF demonstrou ser menos responsiva. A dieta CAF também induziu redução da contratilidade vascular induzida por fenilefrina (PE) na ausência do PVAT, relacionada ao aumento nos níveis séricos de leptina e à ativação de seus receptores, ativação das enzimas PI3K e óxido nítrico sintase endotelial, e produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Por outro lado, a presença do PVAT aumentou a vasoconstrição induzida por PE no grupo CAF, sugerindo um perfil vasoconstritor do PVAT na tentativa de restabelecer a contratilidade vascular, relacionado a ativação dos receptores AT₁, ativação da enzima NADPH oxidase e produção de ânions superóxido, e ativação da enzima ciclooxigenase 1 e dos receptores de tromboxano A₂ e prostaglandina F₂α. Em conjunto, os resultados encontrados demonstraram que a obesidade desencadeada pela dieta CAF predispõe alterações cardíacas e vasculares, com alterações no perfil vasoativo do PVAT. Contudo, o tratamento dietético alternando a dieta CAF para a dieta padrão para roedores se mostrou efetivo para reverter essas alterações.

Palavras-Chave: Obesidade; Sistema Cardiovascular; Leptina; Óxido Nítrico; PVAT; Sistema Renina-Angiotensina; Ciclooxigenase.

Abstract

Obesity is among the most important causes of cardiovascular disease. The perivascular adipose tissue (PVAT) is closely related to the cardiovascular system playing an important role in vascular homeostasis, which may be associated with the progression or regression of cardiovascular diseases related to obesity. Knowing that the cafeteria diet (CAF diet) reflects the variety of highly caloric and easily accessible foods in Western societies, contributing to the development of obesity and metabolic disorders, the aim of this study was to evaluate the impact of CAF diet on the cardiovascular system, as well as its influence on the PVAT vasoactive profile. The results found showed that the CAF diet induced an increase in the body weight and adiposity index, hyperlipidemia, hyperglycemia, glucose intolerance and insulin resistance. The analysis of the electrocardiogram and cardiac function showed that the CAF diet caused a delay in atrioventricular conduction and an increase in baseline left ventricular contractility/relaxation. The same result was observed at the cellular level, in which the CAF diet exacerbated the contraction/relaxation response of cardiomyocytes. However, under a pharmacological stress induced by isoprenaline, left ventricular contractility/relaxation in the CAF group proved to be less responsive. The CAF diet also induced a reduction in vascular contractility induced by phenylephrine (PE) in the absence of PVAT related to the increase in serum leptin levels and the activation of its receptors, activation of PI3K enzymes and nitric oxide endothelial synthase, and production of nitric oxide and hydrogen peroxide. On the other hand, the presence of PVAT increased PE-induced vasoconstriction in the CAF group, suggesting a vasoconstrictor profile of PVAT in an attempt to reestablish the vascular contractility related to the activation of AT₁ receptors, activation of NADPH oxidase and production of superoxide anions, and activation of the cyclooxygenase 1 and the thromboxane A₂ and prostaglandin F_{2α} receptors. Taken together, our findings showed that obesity triggered by CAF diet predisposes to cardiac and vascular alterations, with alterations in the vasoactive profile of PVAT. However, dietary treatment alternating the CAF diet to the standard diet proved to be effective in reversing these changes.

Keywords: Obesity; Cardiovascular System; Leptin; Nitric Oxide; PVAT; Renin-Angiotensin System; Cyclooxygenase.

Lista de Figuras

Figura 1 - Prevalência mundial de obesidade ao longo do tempo.....	1
Figura 2 – Comparação das alterações metabólicas associadas à obesidade induzida pelas dietas do tipo “high fat”, “high carbohydrate” e cafeteria	7
Figura 3 – Expansão do tecido adiposo na obesidade.....	9
Figura 4 – Mecanismos associados ao perfil pró-inflamatório da leptina	10
Figura 5 - Mecanismos associados ao perfil anti-inflamatório da adiponectina.....	11
Figura 6 – Inflamação crônica de baixo grau como um elo importante entre a obesidade e a resistência sistêmica à insulina.....	12
Figura 7 – Diferentes depósitos de gordura ectópica e seus efeitos sistêmicos e locais	13
Figura 8 - Estrutura do vaso sanguíneo em camadas.....	15
Figura 9 - Classificação do PVAT de roedores como tecido adiposo branco ou marrom de acordo com a sua localização anatômica	16
Figura 10 – Diferentes moléculas biologicamente ativas secretadas pelo PVAT com efeitos parácrinos sobre os vasos sanguíneos.....	19
Figura 11 - Influência do PVAT sobre a homeostase vascular durante a obesidade	20
Figura 12 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	25
Figura 13 - Representação esquemática do delineamento experimental para o tratamento dietético.....	39
Figura 14 - Avaliação do (A) consumo de ração, (B) ganho de peso corporal, (C) índice de adiposidade e (D) histologia do tecido adiposo epididimal nos grupos controle e CAF	40
Figura 15 - Testes de (A) tolerância oral a glicose e (B) sensibilidade à insulina, (C) níveis séricos de glicose, (D) triglicerídeos e (E) colesterol total nos grupos controle e CAF	41
Figura 16 - (A) Peso do fígado, (B) gordura total hepática, concentrações de (C) triglicerídeos e (D) colesterol hepáticos, e (E) histologia do fígado nos grupos controle e CAF	42

Figura 17 - (A) Pressão arterial sistólica nos grupos controle e CAF	43
Figura 18 – Eletrocardiograma. (A) ECG representativo dos grupos controle e CAF; (B) Duração da onda P; (C) Intervalo QRS; (D) Intervalo QTc; (E) Intervalo PR; (F) Frequência cardíaca; (G) Amplitude da onda P; (H) Amplitude da onda R; (I) Amplitude da onda T dos grupos controle e CAF	44
Figura 19 - (A) Peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia nos grupos controle e CAF	45
Figura 20 - (A) Pressão de perfusão do coração; (B) Pressão exercida pelo ventrículo esquerdo (PDVE); (C) dP/dt_{max} e (D) dP/dt_{min}	46
Figura 21 - (A) % de mudança da PDVE frente ao estímulo com isoprenalina; (B) E_{max} da % de mudança frente ao estímulo com isoprenalina; (C) dP/dt_{max} e (D) dP/dt_{min} frente ao estímulo com isoprenalina	47
Figura 22 - Medida da (A) área, (B) comprimento e (C) largura dos cardiomiócitos isolados dos grupos controle e CAF.....	47
Figura 23 - Tempo de (A) contração, (B) relaxamento e (C) contração-relaxamento dos cardiomiócitos isolados nos grupos controle e CAF	48
Figura 24 - Velocidade máxima de (A) contração e (B) relaxamento celular; e (C) área de encurtamento dos cardiomiócitos nos grupos controle e CAF	48
Figura 25 - Representação vetorial e gráfica do perfil de contratilidade de cardiomiócitos nos grupos controle e CAF	49
Figura 26 - Contração vascular induzida por PE em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	51
Figura 27 - Relaxamento vascular induzido por ACh em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	52
Figura 28 – Silenciamento do receptor da leptina	54
Figura 29 – Inibição da PI3K com LY294,002 em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	55
Figura 30 – Inibição não seletiva da NOS com L-NAME em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	56

Figura 31 – Biodisponibilidade de NO em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	57
Figura 32 - Silenciamento da isoforma endotelial da NOS	58
Figura 33 - Inibição seletiva da isoforma neuronal da NOS em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	59
Figura 34 - Inibição seletiva da isoforma induzida da NOS em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	60
Figura 35 – Imunofluorescência das isoformas endotelial, neuronal e induzida na NOS	61
Figura 36 – Retirada do endotélio vascular em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	62
Figura 37 - Participação do H ₂ O ₂ em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	63
Figura 38 – Biodisponibilidade de H ₂ O ₂ em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF	64
Figura 39 – Inibição simultânea da NOS e H ₂ O ₂	65
Figura 40 - Inibição da ECA em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	66
Figura 41 - Antagonismo do receptor AT ₁ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	67
Figura 42 – Sequestro de O ₂ ⁻ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	68
Figura 43 – Produção de O ₂ ⁻ em aortas com PVAT dos grupos controle e CAF.....	69
Figura 44 – Inibição da NADPH oxidase em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	70
Figura 45 - Inibição da COX em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	71
Figura 46 - Inibição seletiva da COX ₁ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	72

Figura 47 - Inibição seletiva da COX ₂ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	73
Figura 48 – Imunofluorescência das isoformas da COX ₁ e COX ₂	74
Figura 49 - Antagonismo do receptor de prostaglandina F _{2α} em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	75
Figura 50 - Antagonismo do receptor de tromboxano A ₂ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF	76
Figura 51 - Avaliação do (A) peso corporal e (B) índice de adiposidade dos grupos controle e CAF-tratado	77
Figura 52 - (A) Pressão de perfusão do coração; (B) Pressão exercida pelo ventrículo esquerdo (PDVE); (C) dP/dt _{max} e (D) dP/dt _{min}	78
Figura 53 - (A) % de mudança da PDVE frente ao estímulo com isoprenalina; (B) E _{max} da % de mudança frente ao estímulo com isoprenalina; (C) dP/dt _{max} e (D) dP/dt _{min} frente ao estímulo com isoprenalina	79
Figura 54 - Contração vascular induzida por PE em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF-tratado	80
Figura 55 - Mecanismos propostos envolvidos nas alterações cardiometabólicas induzidas pela obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria	97

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição Nutricional das Dietas Controle e Cafeteria.....24

Tabela 2 – Níveis Séricos de Adipocinas nos Grupos Controle e CAF42

Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
ADRF	<i>Adipocyte-Derived Relaxing Factor</i> - Fator de Relaxamento Derivado de Adipócito
Akt	Proteína quinase B ou PKB
Ang II	Angiotensina II
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
ANOVA	Análise de Variância
AT ₁	Receptor do Tipo 1 para Angiotensina II
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> - Albumina de Soro Bovino
°C	Graus Celsius
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CCL2	Proteína Quimioatraente para Monócitos
COX	Ciclooxigenase
CO ₂	Dióxido de Carbono
Ctl	Grupo Controle
CXCL1	Proteína Quimioatraente para Neutrófilos
DAF-2DA	4 – Amino – 5 – Metilamino - 2', 7' - Difluorofluoresceína Diacetato
DCF-DA	2', 7' - Diacetato de Diclorofluoresceína
ECA	Enzima Conversora de Angiotensinogênio
EC ₅₀	Concentração necessária para gerar 50% da resposta correspondente ao efeito máximo
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i> - Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio Enzimático de Imunoabsorbância
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> - Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
g	Gramas (Unidade de Massa)
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
IFN-γ	Interferon-γ
IL- ()	Interleucina ()
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> - Óxido Nítrico Sintase Induzida

KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
L-NAME	L-N ^G -nitroarginina metil éster
LY-294,002	Inibidor Seletivo da PI3K
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 - Proteína Quimiotática de Monócito-1
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
mN	Milnewton (Unidade de Força)
mol/L	Mol por Litro (Unidade de Medida de Concentração)
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
nm	Nanômetro
NO	<i>Nitric Oxide</i> - Óxido Nítrico
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i> - Óxido Nítrico Sintase
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i> - Óxido Nítrico Sintase Neuronal
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature</i> - Resina para Congelamento Rápido de Tecidos e Corte em Criostato
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão Fosfato Salino
pD ₂	Potência de Contração ou Relaxamento (calculado como -log EC ₅₀)
pH	Potencial Hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Quinase
PVAT	<i>Perivascular Adipose Tissue</i> - Tecido Adiposo Perivascular
RNA _m	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico Mensageiro
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> - Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> - Fator de Necrose Tumoral-alfa
UA	Unidades Arbitrárias
UCP-1	<i>Uncoupling Protein-1</i> - Proteína Desacoplada-1
7Ni	7-Nitroindazol - Inibidor Seletivo para Isoforma Neuronal da NOS
1400W	Inibidor Seletivo para Isoforma Induzida da NOS

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	Epidemiologia da Obesidade	1
1.2	Dietas Ocidentais e o Desenvolvimento da Obesidade.....	4
1.3	Obesidade como Fator de Risco para Doenças Cardiovasculares	8
1.4	Papel do Tecido Adiposo Perivascular na Obesidade e Doenças Cardiovasculares	14
2	Objetivos.....	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	Materiais e Métodos.....	24
3.1	Animais e Delineamento Experimental.....	24
3.2	Peso Corporal, Consumo de Ração e Índice de Adiposidade.....	25
3.3	Registro da Pressão Arterial Sistólica	25
3.4	Testes de Tolerância Oral à Glicose e Sensibilidade à Insulina.....	25
3.5	Determinação dos Parâmetros Séricos.....	26
3.6	Determinação de Adipocinas no Soro por ELISA.....	26
3.7	Peso dos Órgãos	27
3.8	Extração da Gordura Hepática.....	27
3.9	Análise Histológica	27
3.10	Eletrocardiograma	27
3.11	Função Cardíaca.....	28
3.12	Contratilidade dos Cardiomiócitos.....	28
3.13	Reatividade Vascular	29
3.14	Mecanismos de Ação Envolvidos na Hiporresponsividade Aórtica	31
3.14.1	Silenciamento do Receptor da Leptina	31
3.14.2	Ativação da Via PI3K-AKT-NOS.....	32

3.14.3	Silenciamento da Isoforma Endotelial da NOS	32
3.14.4	Participação do Endotélio Vascular	33
3.14.5	Participação do Peróxido de Hidrogênio.....	33
3.14.6	Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio...33	
3.14.7	Imunomarcção das Isoformas Endotelial, Induzida e Neuronal da NOS 34	
3.15	Mecanismos de Ação Envolvidos no Perfil Vasoconstritor do PVAT Induzido pela Dieta de Cafeteria	35
3.15.1	Ativação do Sistema Renina-Angiotensina.....	35
3.15.2	Participação da Enzima NADPH Oxidase e Produção de Ânions Superóxido.....	36
3.15.3	Ativação da Enzima Ciclooxigenase e Produção de Mediadores Vasoconstritores	36
3.15.4	Determinação dos Níveis de Ânions Superóxido.....	37
3.15.5	Imunomarcção das Isoformas COX ₁ e COX ₂	37
3.16	Tratamento Dietético.....	38
3.17	Análise Estatística.....	39
4	Resultados.....	40
4.1	Alterações Metabólicas Desencadeadas pela Dieta de Cafeteria.....	40
4.2	Alterações Cardíacas Desencadeadas pela Dieta de Cafeteria.....	43
4.2.1	Pressão Arterial Sistólica.....	43
4.2.2	Eletrocardiograma	43
4.2.3	Peso do Coração.....	45
4.2.4	Função Cardíaca	45
4.2.5	Contratilidade dos Cardiomiócitos	47
4.3	Alterações Vasculares Desencadeadas pela Dieta de Cafeteria	50
4.3.1	Caracterização da Contração Vascular Induzida por PE.....	50
4.3.2	Caracterização do Relaxamento Vascular Induzido por ACh.....	51

4.3.3	Mecanismos de Ação Envolvidos na Hiporresponsividade Aórtica Desencadeada pela Dieta de cafeteria	53
4.3.3.1	Ativação do Receptor da Leptina	53
4.3.3.2	Ativação da PI3K.....	54
4.3.3.3	Ativação da NOS.....	55
4.3.3.4	Determinação dos Níveis de NO	56
4.3.3.5	Participação das Isoformas das NOS.....	57
4.3.3.6	Imunofluorescência das Isoformas da NOS	60
4.3.3.7	Participação do Endotélio Vascular	61
4.3.3.8	Participação do Peróxido de Hidrogênio	62
4.3.3.9	Determinação dos Níveis de H ₂ O ₂	63
4.3.3.10	Coparticipação da NOS e do H ₂ O ₂	64
4.3.4	Mecanismos de Ação Envolvidos no Perfil Vasoconstritor do PVAT	65
4.3.4.1	Ativação do Sistema Renina-Angiotensina.....	65
4.3.4.2	Produção de O ₂ ⁻	68
4.3.4.3	Determinação dos Níveis de O ₂ ⁻	69
4.3.4.4	Ativação da NADPH oxidase.....	69
4.3.4.5	Ativação da COX.....	70
4.3.4.6	Imunofluorescência das Isoformas da COX	73
4.3.4.7	Participação dos Derivados da COX: Prostaglandina F ₂ α e Tromboxano A ₂	74
4.4	Tratamento Dietético	76
5	Discussão	81
6	Conclusão.....	97

1 Introdução

1.1 Epidemiologia da Obesidade

Ao longo dos últimos 40 anos, a prevalência mundial de sobrepeso e obesidade quase triplicou alcançando proporções epidêmicas, sendo atualmente considerada por muitos como a epidemia do século 21 (Figura 1). Essa prevalência se traduz a um custo global de saúde equivalente a 2,8% do produto interno bruto mundial, ou aproximadamente US\$ 2 trilhões, representando um importante problema de saúde pública (González-Muniesa et al., 2017).

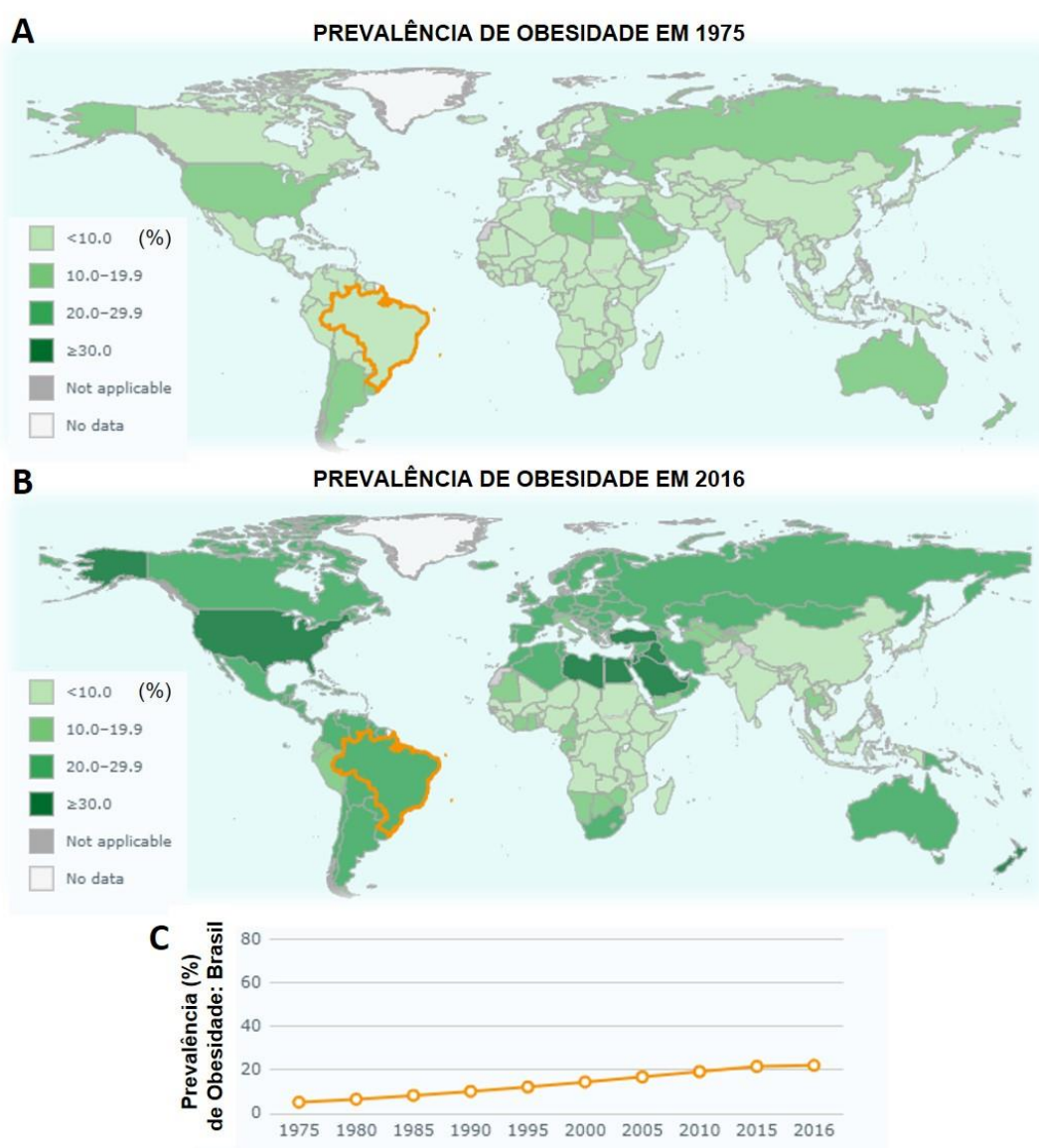


Figura 1 - Prevalência mundial de obesidade ao longo do tempo. Porcentagem mundial de adultos definidos como obesos em (A) 1975 e (B) 2016. (C) Prevalência de obesidade no Brasil ao longo dos anos. Fonte: World Health Organization - WHO, 2016, Global Health Observatory.

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), até o ano de 2016 a prevalência mundial de sobrepeso e obesidade alcançava mais de um terço da população mundial, com 1,9 bilhão (39%) de adultos com excesso de peso no mundo, sendo 650 milhões (13%) considerados obesos (World Health Organization - WHO, 2016). No Brasil, a prevalência de sobrepeso e obesidade é ainda mais alarmante. No levantamento também realizado pela OMS em 2016, mais da metade da população brasileira (56,5%) se encontrava acima do peso, sendo 22,1% considerados obesos (World Health Organization - WHO, 2016).

O aumento nas taxas de sobrepeso e obesidade não se restringe apenas à população adulta, como também vem afetando rapidamente as crianças (Peavy, 2009). De 1975 a 2016, a prevalência mundial de crianças e adolescentes com sobrepeso ou obesidade entre 5 e 19 anos de idade aumentou mais de quatro vezes, de 4% para 18% em todo o mundo, o que representa um total de mais de 340 milhões de crianças e adolescentes com excesso de peso ou obesidade (World Health Organization - WHO, 2016). Esse levantamento é particularmente preocupante para a previsão de como a obesidade poderá afetar a população em um futuro próximo. Estimativas preveem que até 2030 mais da metade da população mundial (57,8%) esteja com sobrepeso ou obesidade, o equivalente à 3,3 bilhões de adultos em todo o mundo (Kelly et al., 2008; Finkelstein et al., 2012).

A alta prevalência da obesidade na década de 1970 era, até então, considerada um problema apenas em países de alta renda, especialmente em ambientes urbanos. Posteriormente essa prevalência se estendeu pela maioria dos países de média renda e, mais recentemente, por alguns países de baixa renda (Blüher, 2019), afetando todas as raças, etnias, gêneros e faixa etária, embora existam disparidades entre eles (Peavy, 2009).

Mudanças no estilo de vida, ao longo dos anos, envolvendo hábitos alimentares e exercícios físicos, como o consumo excessivo de nutrientes contendo alto teor calórico, principalmente gorduras e carboidratos refinados, aliado ao estilo de vida cada vez mais sedentário, são listados como as principais causas da epidemia de obesidade (World Health Organization - WHO, 2016). No entanto, a patogênese da obesidade é ainda mais complexa e multifatorial, envolvendo também a interação entre comportamento, ambiente, fatores genéticos, sociais e econômicos (González-Muniesa et al., 2017).

Em geral, de acordo com a OMS, a obesidade é definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura que apresenta risco à saúde (World Health Organization - WHO, 2016). Diferentes estudos populacionais mostraram que indivíduos obesos apresentam maior risco de desenvolver inúmeras complicações de saúde, aumentando substancialmente o risco de diferentes doenças, como doenças metabólicas, doenças cardiovasculares, doença músculo-esquelética, doença de Alzheimer, depressão e diferentes tipos de câncer (Blüher, 2019). Porém, é importante ressaltar que, de acordo com a Federação Mundial de Obesidade, a obesidade é uma doença crônica progressiva claramente distinta de ser apenas um fator de risco para outras doenças (Bray et al., 2017).

As consequências adversas da obesidade emergiram nos últimos anos como uma maior ameaça à saúde pública do que a fome ou a desnutrição (Bhupathiraju and Hu, 2016). Atualmente, a maior parte da população mundial vive em países onde o sobrepeso e a obesidade levam mais pessoas à óbito do que a desnutrição, com mais de 4 milhões de pessoas morrendo a cada ano no mundo como resultado do excesso de peso ou obesidade (World Health Organization - WHO, 2016).

Muitas vezes as causas da obesidade são evitáveis e reversíveis. Ainda assim, até o momento nenhum país conseguiu reverter o crescimento dessa epidemia (Roberto et al., 2015; Blüher, 2019). Vivemos em ambientes cada vez mais obesogênicos que influenciam profundamente nosso comportamento e estilo de vida.

Inúmeros trabalhos vêm explorando os mecanismos biológicos relacionados à obesidade com o objetivo de projetar intervenções para manter um peso corporal saudável (Puhl and Heuer, 2010; Apovian, 2016; Caballero, 2019). Os esforços de pesquisa têm melhorado cada vez mais nossa compreensão sobre as principais causas do aumento da prevalência da obesidade. Contudo, o principal desafio é transformar essa compreensão em ações eficazes, como incluir mudanças sociais e ambientais que facilitem as escolhas individuais por alimentos saudáveis, com teor reduzido em gorduras e carboidratos refinados, e o acesso à atividade física regular.

1.2 Dietas Ocidentais e o Desenvolvimento da Obesidade

Como abordado anteriormente, embora outros fatores possam estar envolvidos, a obesidade surge como resultado de um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas, criando um excedente de energia e um estado de equilíbrio energético positivo resultando no acúmulo de gordura corporal (González-Muniesa et al., 2017). Assim, o papel de dietas e atividades físicas na mitigação dos riscos da obesidade e na redução da sua prevalência tem sido de grande interesse ao longo dos últimos anos (Hruby and Hu, 2015).

O consumo excessivo de nutrientes contendo alta densidade calórica, como gorduras e carboidratos refinados, é em grande parte responsável pela crescente epidemia de obesidade (Azevedo and Brito, 2012). Evidências sugerem que o aumento simultâneo da prevalência da obesidade em quase todos os países parece ser causado principalmente por mudanças no ambiente alimentar moderno, especialmente no ocidente, caracterizado por alimentos e bebidas processados, com alto teor calórico, preços comparativamente baixos, disponibilidade imediata e ampla escolha e variedade (Barrett et al., 2016).

A relevância da obesidade em todo o mundo tem fomentado uma busca contínua por melhores modelos para estudar a sua patogênese. Nesse contexto, estudos dietéticos em modelos animais permitem intervenções controladas e o isolamento de diferentes tecidos para análises metabólicas e moleculares, se mostrando cruciais para elucidar os efeitos mecanísticos de nutrientes e dietas específicas no desenvolvimento da obesidade (Pinheiro-Castro et al., 2019). No entanto, a escolha do melhor modelo de obesidade induzida por dieta que reflete com maior precisão a patologia da obesidade humana permanece em debate.

Em um dos primeiros relatos em que a obesidade foi induzida com sucesso apenas com dieta, diferentes linhagens de camundongos foram alimentadas com dietas *ad libitum* contendo teor de gordura variando de 5% a 47,5% (FENTON and DOWLING, 1953). Desde então, diversos modelos experimentais foram desenvolvidos para induzir obesidade e distúrbios metabólicos relacionados por meio de intervenções dietéticas. Atualmente, diferentes modelos de obesidade induzida por dieta são utilizados, incluindo dietas ricas em lipídeos (“*high fat diet*”), dietas ricas em carboidratos refinados (“*high carbohydrate diet*”) e dietas do tipo cafeteria (“*cafeteria diet*”). Esses modelos de dieta apresentam fenótipos de

obesidade nos quais a gordura corporal se acumula ao longo de um período de tempo relativamente longo, embora as consequências metabólicas prejudiciais possam ser aparentes dentro de alguns dias (Barrett et al., 2016).

A maioria dos modelos de obesidade induzida por dieta em roedores utilizam a administração de dietas com alto teor de gordura (*“high fat diet”*). As dietas do tipo *“high fat”* geralmente consistem em uma troca de calorias derivadas de carboidratos e proteínas por calorias derivadas de gordura quando comparadas às dietas controle (Zeeni et al., 2015). A fonte e a proporção da gordura utilizada podem variar entre 20 a 60% kcal, provenientes de óleos vegetais, como sementes de girassol e óleos de soja, ou gordura de origem animal, como banha de porco e sebo bovino (Pinheiro-Castro et al., 2019). Contudo, ainda não existe consenso sobre qual composição seria a mais apropriada (Bortolin et al., 2018; Pinheiro-Castro et al., 2019). Assim, os fenótipos observados, bem como os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, podem variar entre os diferentes estudos e, portanto, tornar as comparações entre eles um desafio (Bortolin et al., 2018).

O efeito prejudicial de dietas ricas em lipídios já é bem documentado em trabalhos que demonstram que a administração a longo prazo de dietas contendo 40-60% de gordura promove alterações metabólicas, aumento da adiposidade associada a inflamação crônica sistêmica de baixo grau, com aumento nas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias e, como consequência, contribuem para o desenvolvimento da obesidade e doenças relacionadas (Flanagan et al., 2008). No entanto, esse modelo de obesidade induzida por dieta vem sendo criticado por não representar plenamente os hábitos alimentares da sociedade ocidental. Ainda assim, inúmeros trabalhos têm demonstrado a participação de dietas *“high fat”* no desenvolvimento da obesidade e doenças relacionadas em animais experimentais (Shepard et al., 2001; Cameron-Smith et al., 2003; Weisberg et al., 2006; Buettner et al., 2007; Lee et al., 2011).

Embora as dietas *“high fat”* sejam bem-sucedidas em induzir obesidade e distúrbios metabólicos relacionados, outras dietas são tão ou até mais eficazes. As dietas do tipo *“high carbohydrate diet”* e *“cafeteria diet”* estão entre elas. O diferencial dessas dietas se deve ao fato de que elas costumam ter como objetivo mimetizar mais precisamente os hábitos alimentares da sociedade ocidental (Pinheiro-Castro et al., 2019).

O aumento no consumo de carboidratos refinados associado a um estilo de vida sedentário também têm contribuído para a prevalência da obesidade e doenças relacionadas (Lumeng et al., 2007; Ferreira et al., 2011). Estudos demonstraram que animais alimentados com dieta do tipo “*high carbohydrate*” durante diferentes períodos de tempo apresentaram aumento da adiposidade a partir de 1 dia, permanecendo por até 12 semanas (Oliveira et al., 2013). Além disso, dietas enriquecidas em carboidratos refinados também levaram ao desenvolvimento de dislipidemia aterogênica, intolerância à glicose e resistência à insulina, acompanhadas de variações no perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias liberadas pelo tecido adiposo (Oliveira et al., 2013). Dessa forma, diferentes trabalhos vêm fazendo uso de dietas do tipo “*high carbohydrate*” como modelo de estudo da patogênese da obesidade e doenças relacionadas (Oliveira et al., 2014; Veloso et al., 2019; Zicker et al., 2019; Reis Costa et al., 2021). Contudo, essas dietas ainda são menos utilizadas do que as tradicionais dietas do tipo “*high fat*”.

Já as chamadas “dietas de cafeteria” são atraentes modelos de dietas obesogênicas contemporâneas (Barrett et al., 2016). O termo “cafeteria” foi originalmente utilizado para denotar a variedade de alimentos processados facilmente encontrados nas dietas ocidentais em que a maioria dos itens escolhidos é hipercalórica (Shafat et al., 2009). Essas dietas normalmente fornecem aos roedores uma mistura variada de alimentos processados doces e salgados retirados da despensa humana, com alto teor tanto de gordura quanto de carboidratos refinados, e por isso, simulam relativamente mais de perto a dieta ocidental humana, podendo ser utilizadas para investigar os efeitos do consumo excessivo de alimentos industrializados e altamente processados, característico da sociedade ocidental, no desenvolvimento da obesidade e doenças relacionadas (Barrett et al., 2016).

Rothwell e colaboradores (1982), foram pioneiros em utilizar esse modelo de obesidade induzida por dieta do tipo cafeteria, em que os animais recebiam quatro itens alimentares humanos por dia, retirados de uma seleção de mais de 40 alimentos, criando um regime que resultou em aumento na ingestão de calorias e, conseqüentemente, no acúmulo de gordura corporal em um período de apenas 15 dias (Rothwell et al., 1982). Atualmente, diferentes estudos vêm demonstrando o uso de dietas do tipo cafeteria como um modelo animal robusto de síndrome metabólica, relacionado ao aumento da adiposidade corporal, inflamação do tecido adiposo e do

fígado, esteatose hepática, intolerância à glicose, resistência à insulina e acúmulo de lipídios pancreáticos, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade e doenças relacionadas (Shafat et al., 2009; Zeeni et al., 2015; Oliveira et al., 2017).

Zeeni e colaboradores (2015), compararam as alterações metabólicas associadas à obesidade induzida pelas dietas do tipo “high fat”, “high carbohydrate” e cafeteria. Os resultados encontrados demonstraram que a dieta de cafeteria induziu aumento no peso e adiposidade corporal, e aumento nos níveis séricos de glicose, insulina e colesterol em maiores proporções e em um menor espaço de tempo quando comparado à clássica dieta “high fat” ou à “high carbohydrate” (Figura 2).

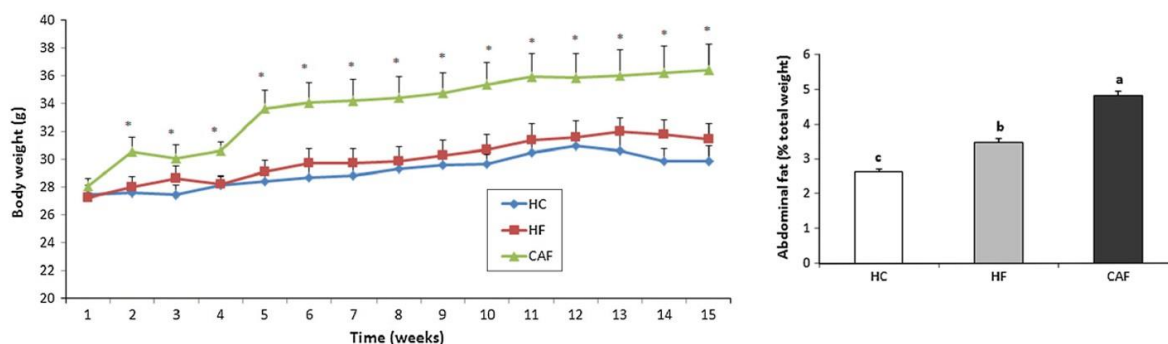


Table 3 Serum and urine parameters for mice fed a standard chow, high-fat, or cafeteria diet for 15 weeks ($n = 10$)

	HC diet		HF Diet		CAF Diet	
Total cholesterol (mg/dL)	45.8	$\pm 3.9^a$	56.6	$\pm 3.6^b$	66	$\pm 3.6^c$
LDL cholesterol	11.5	$\pm 1.9^a$	16.4	$\pm 1.5^b$	17.7	$\pm 2.1^b$
HDL cholesterol	28.6	± 2.3	31.9	± 3.1	35.7	± 3.9
Fasted glucose (mg/dL)	106.6	± 6.1	97	± 5.7	96.9	± 5.7
Glucose after ipGTT (mg/dL)	136.5	$\pm 4.4^a$	147.3	$\pm 5.3^{ab}$	155.2	$\pm 4.7^b$
Insulin (pg/mL)	732.2	$\pm 43.2^a$	938	$\pm 85.9^b$	1023	$\pm 101.5^b$
Adiponectin (pg/mL)	13.9	$\pm 0.2^b$	13.7	$\pm 0.2^{ab}$	13	$\pm 0.2^a$
Interleukin-6 (pg/mL)	4.8	$\pm 1.1^a$	6.3	$\pm 1.6^b$	16.9	$\pm 3.4^c$
UACR	40.5	± 4.2	39.6	± 3	40.5	± 4.3

Figura 2 – Comparação das alterações metabólicas associadas à obesidade induzida pelas dietas do tipo “high fat”, “high carbohydrate” e cafeteria. (A) Peso Corporal, (B) Índice de Adiposidade e (C) Diferentes Parâmetros Séricos. Análises realizadas por Zeeni et al. (2015).

Por essa razão, a dieta de cafeteria foi considerada por alguns investigadores como um modelo de obesidade induzida por dieta superior, por refletir com maior precisão a variedade de alimentos altamente calóricos prevalentes na sociedade ocidental e também por induzir obesidade e distúrbios metabólicos relacionados de maneira mais eficiente (Bortolin et al., 2018), sendo cuidadosamente escolhida como o modelo de obesidade induzida por dieta para o tema em estudo desse trabalho.

1.3 Obesidade como Fator de Risco para Doenças Cardiovasculares

Evidências clínicas e epidemiológicas apontam a obesidade como um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, aterosclerose, fibrilação atrial, insuficiência cardíaca e morte súbita cardíaca (Poirier et al., 2006; Koliaki et al., 2018), que de acordo com a Organização Mundial de Saúde representam a causa número 1 de mortes em todo o mundo, com cerca de 17,9 milhões de óbitos a cada ano (World Health Organization, 2018). Embora a relação entre o aumento da adiposidade e a disfunção cardiovascular seja bem documentada, os mecanismos moleculares que acompanham a progressão da obesidade e o risco de doenças cardiovasculares ainda não são totalmente compreendidos, sendo foco de extensivas pesquisas e debates ao longo dos últimos anos (Lavie et al., 2009; Ortega et al., 2016; Carbone et al., 2018; Da Costa et al., 2019).

Uma vez que a obesidade está fortemente relacionada a comorbidades coexistentes, incluindo resistência à insulina, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão arterial e estados pró-trombóticos e pró-inflamatórios, que em conjunto compreendem a síndrome metabólica, esses fatores de risco são considerados etapas intermediárias importantes na relação causal entre a obesidade e o risco cardiovascular (Grundy et al., 2004; Safar et al., 2006). Contudo, embora seja difícil separar a contribuição desses diferentes fatores de risco que geralmente estão correlacionados por mecanismos fisiopatológicos comuns, de acordo com a *American Heart Association*, a obesidade em si é considerada um preditor de doenças cardiovasculares independente da associação entre os componentes da síndrome metabólica ou outros fatores de risco (Eckel and Krauss, 1998; Csige et al., 2018).

Para compreender como a obesidade tem impacto na função cardiovascular, é importante primeiramente destacar as mudanças induzidas pela obesidade no microambiente do tecido adiposo. O tecido adiposo é composto não apenas por adipócitos como também por outros tipos de células, incluindo linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células vasculares (Nakamura et al., 2014). Além de ser considerado o maior reservatório energético do corpo, o tecido adiposo é reconhecido como um importante órgão endócrino altamente dinâmico capaz de produzir e secretar numerosas substâncias bioativas, coletivamente denominadas

adipocinas, com funções endócrinas, parácrinas e autócrinas envolvidas em uma variedade de processos biológicos, incluindo o metabolismo energético e as funções neuroendócrina, imunológica e cardiovascular (Kershaw and Flier, 2004; Miao and Li, 2012).

Em um quadro de obesidade, em resposta à ingestão excessiva de calorias, o tecido adiposo se expande por meio de alterações morfológicas inicialmente impulsionadas pelo aumento no número de adipócitos (hiperplasia), mediada pelo recrutamento e proliferação de precursores adipogênicos (Faust et al., 1978; Nakamura et al., 2014; Koliaki et al., 2018). A exposição sustentada à ingestão excessiva de calorias é seguida pelo aumento no tamanho dos adipócitos (hipertrofia), resultando em angiogênese prejudicada e rarefação capilar, reduzindo a entrega de nutrientes e oxigênio ao tecido adiposo, levando à hipóxia e morte celular necrótica e/ou apoptótica dos adipócitos (Figura 3). Esse processo é acompanhado pela polarização de macrófagos residentes no tecido adiposo do tipo M2 em direção ao fenótipo pró-inflamatório do tipo M1, e pelo recrutamento e infiltrado de células inflamatórias, incluindo linfócitos T e B, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos, contribuindo para a disfunção do tecido adiposo (Strissel et al., 2007; Nakamura et al., 2014; Koliaki et al., 2018; Oikonomou and Antoniadis, 2019).

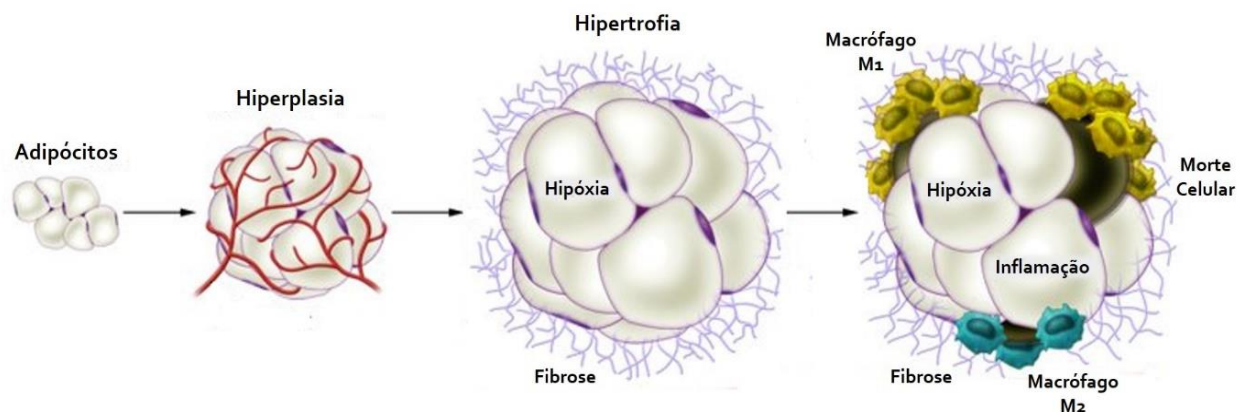


Figura 3 – Expansão do tecido adiposo na obesidade. Adaptado de Sun et al. (2011).

Os adipócitos hipertrofiados disfuncionais na obesidade levam à secreção desregulada de adipocinas pró e anti-inflamatórias com efeitos locais e sistêmicos, desencadeando uma inflamação crônica sistêmica de baixo grau caracterizada pelo aumento moderado de adipocinas pró-inflamatórias circulantes (Mraz and Haluzik, 2014). Apesar de sua menor intensidade em comparação a outros modelos de

resposta inflamatória generalizada, a inflamação induzida pela obesidade contribui para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (Nakamura et al., 2014).

Dentre as principais adipocinas secretadas pelos adipócitos, a leptina e a adiponectina são as adipocinas mais abundantes e que desempenham importante papel na relação fisiopatológica entre o aumento da adiposidade e alterações cardiometabólicas (Zhao et al., 2021). Os níveis fisiológicos normais de adiponectina e leptina são essenciais para manter a função cardiovascular adequada. Contudo, a obesidade está associada a altos níveis circulantes de leptina (hiperleptinemia) e baixos níveis circulantes de adiponectina (hipoadiponectinemia) (Ghantous et al., 2015).

A hiperleptinemia geralmente é associada a um mecanismo compensatório para superar a resistência à leptina induzida pela obesidade (Landecho et al., 2019). Os níveis elevados de leptina se correlacionam à um perfil pró-inflamatório ao induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-12 (IL-12), e ao aumentar a fagocitose pelos macrófagos e induzir ativação, proliferação e migração de monócitos (Figura 4), contribuindo para os distúrbios metabólicos e cardiovasculares (Tilg and Moschen, 2006).

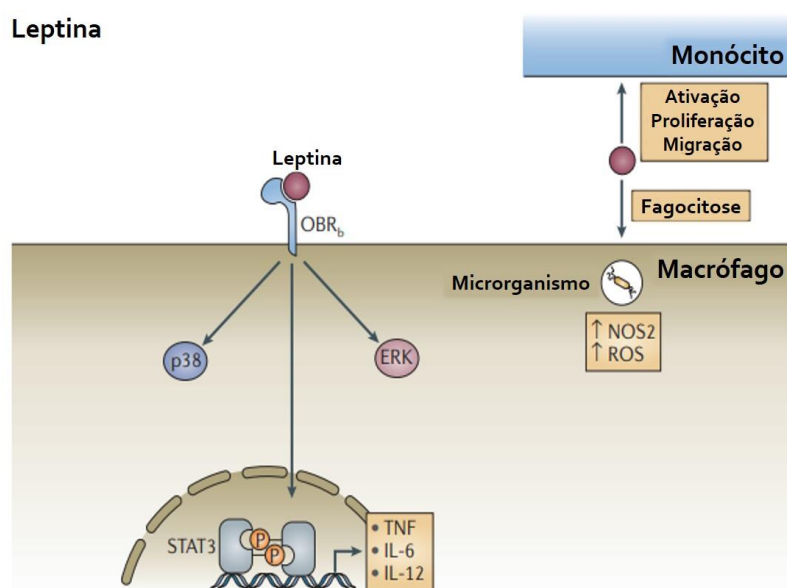


Figura 4 – Mecanismos associados ao perfil pró-inflamatório da leptina. Adaptado de Tilg and Moschen (2006).

Por outro lado, os níveis de adiponectina circulantes se correlacionam à um perfil anti-inflamatório ao suprimir a síntese de $\text{TNF-}\alpha$ e interferon- γ ($\text{IFN}\gamma$), além de induzir a produção de IL-10 e do antagonista do receptor de IL-1 (IL1-RA), e também induzir a apoptose de monócitos e inibir a fagocitose por macrófagos (Figura 5), indicando seu papel cardioprotetor no sistema cardiovascular, o qual estaria prejudicado na obesidade devido aos baixos níveis circulantes de adiponectina (Tilg and Moschen, 2006; Ghantous et al., 2015). Assim, tanto a hiperleptinemia quanto a hipoadiponectinemia associadas à obesidade são consideradas biomarcadores importantes para prever desfechos inflamatórios, metabólicos e cardiovasculares (Zhao et al., 2021).

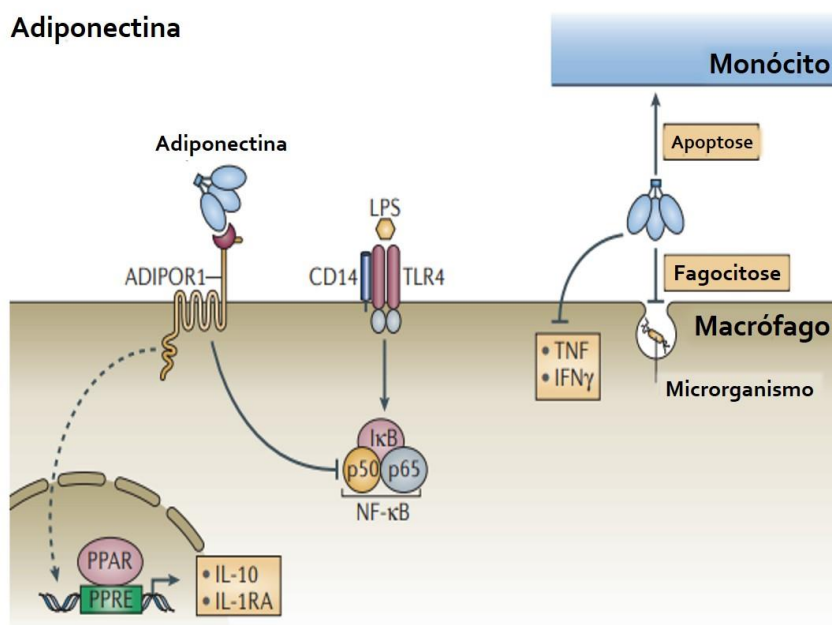


Figura 5 - Mecanismos associados ao perfil anti-inflamatório da adiponectina. Adaptado de Tilg and Moschen (2006).

A inflamação crônica de baixo grau induzida pela secreção desregulada de adipocinas e pelo aumento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos residentes no tecido adiposo é considerada um elo importante entre a obesidade e a resistência sistêmica à insulina (Tilg and Moschen, 2006). As concentrações séricas de vários marcadores pró-inflamatórios, como $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) mostraram estar correlacionadas à expansão do tecido adiposo na obesidade e ao desenvolvimento da resistência sistêmica à insulina, induzindo a expressão e liberação de mediadores inflamatórios importantes que promovem a degradação do receptor da insulina,

inibindo diretamente a sua sinalização celular (Figura 6) (Spranger et al., 2003; Hammarstedt et al., 2018).

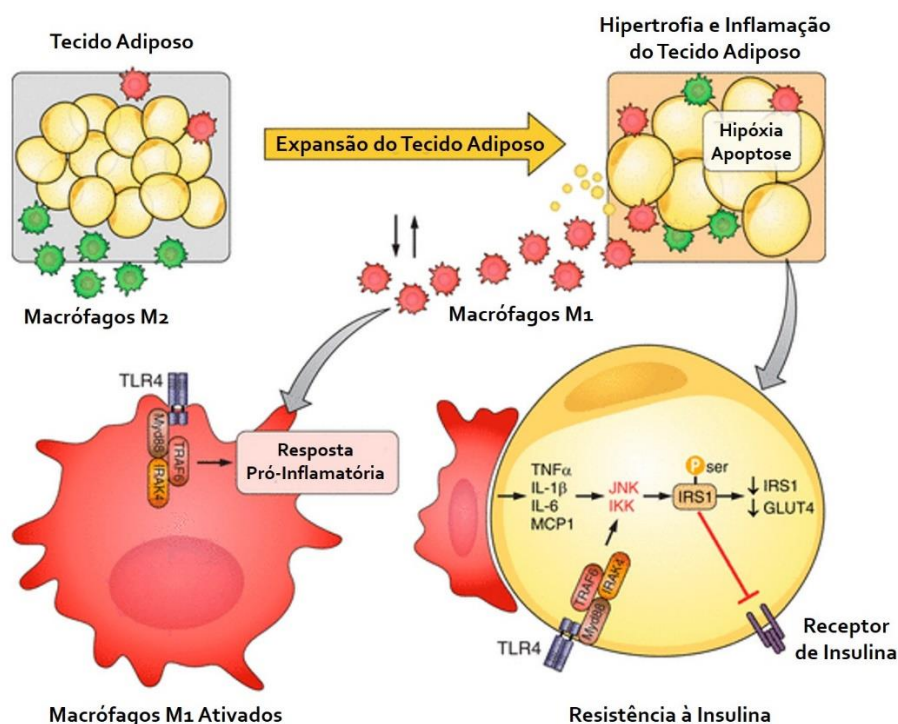


Figura 6 – Inflamação crônica de baixo grau como um elo importante entre a obesidade e a resistência sistêmica à insulina. Adaptado de Hammarstedt et al. (2018).

É importante ressaltar que o perfil biológico do tecido adiposo depende não apenas da sua expansão como também da sua distribuição. A distribuição da gordura corporal é considerada determinante para o risco de doenças metabólicas e cardiovasculares (Britton and Fox, 2011). O tecido adiposo está disperso por todo o corpo em depósitos que variam de 5 a 60% do peso corporal total (Cinti, 2001), podendo ser dividido em dois depósitos anatômicos principais de acordo com sua distribuição, conhecidos como tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral (Landecheo et al., 2019).

Estudos epidemiológicos relacionam a expansão do tecido adiposo visceral com o elevado risco cardiometabólico, em oposição ao perfil neutro ou até mesmo cardioprotetor do tecido adiposo subcutâneo (Oikonomou and Antoniadou, 2019). O tecido adiposo visceral demonstrou ser metabolicamente mais ativo em comparação ao tecido adiposo subcutâneo, apresentando níveis mais elevados de mediadores pró-inflamatórios e níveis mais baixos de mediadores anti-inflamatórios em comparação ao tecido adiposo subcutâneo, estando mais associado a complicações

metabólicas e a uma maior incidência de doenças cardiovasculares (Peavy, 2009; Landecho et al., 2019).

O acúmulo de gordura visceral na obesidade é considerado um marcador do acúmulo de gordura ectópica (Britton and Fox, 2011). A gordura ectópica é definida pelo excesso de tecido adiposo em locais classicamente não associados ao armazenamento de tecido adiposo, como fígado, músculo esquelético, rim e coração, quando o tecido adiposo atinge sua limitação quanto à capacidade de armazenar gordura (Britton and Fox, 2011).

Os depósitos de gordura ectópica com efeitos predominantemente sistêmicos incluem tecido adiposo visceral, fígado e músculo esquelético, enquanto os depósitos de gordura ectópica com potenciais efeitos locais incluem pericárdio, rim, miocárdio e gordura perivascular (Figura 7) (Britton and Fox, 2011). O acúmulo excessivo de lipídios nos tecidos leva à formação de diferentes moléculas lipotóxicas que promovem disfunção celular, inflamação local e resistência à insulina, contribuindo para o risco elevado de doença cardiovasculares associadas à obesidade (Britton and Fox, 2011; Hammarstedt et al., 2018).

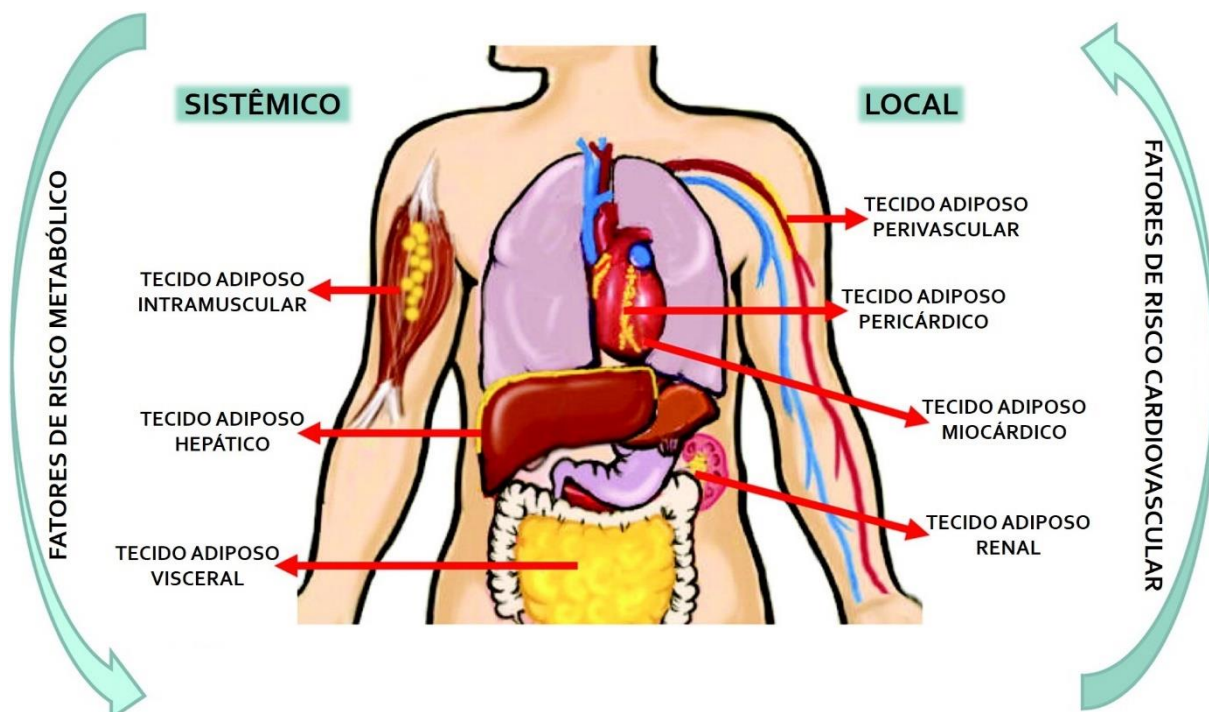


Figura 7 – Diferentes depósitos de gordura ectópica e seus efeitos sistêmicos e locais. Adaptado de Britton and Fox (2011).

Assim, podemos dizer que, em conjunto, a expansão e disfunção do tecido adiposo na obesidade induz consequências locais e sistêmicas as quais fornecem mecanismos diretos e indiretos para a associação entre obesidade e doenças cardiovasculares (Oikonomou and Antoniadis, 2019). As consequências locais incluem hipóxia, inflamação e secreção desregulada de adipocinas pró e anti-inflamatórias. Já as consequências sistêmicas compreendem resistência à insulina, metabolismo anormal de glicose e lipídeos, um estado pró-inflamatório e pró-trombótico, disfunção endotelial e hipertensão (Poirier et al., 2006; Piche et al., 2018).

1.4 Papel do Tecido Adiposo Perivascular na Obesidade e Doenças Cardiovasculares

Embora a expansão do tecido adiposo visceral na obesidade seja comumente associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares, é crescente o interesse na descoberta do papel que o acúmulo de gordura localizada ao redor dos vasos sanguíneos desempenha na patogênese da disfunção vascular (Brown et al., 2014). O tecido adiposo perivascular (PVAT) situa-se ao redor da camada adventícia dos vasos sanguíneos em diversos leitos vasculares com grande, médio e pequeno calibre, tendo uma conhecida função de proteção e suporte vascular e depósito de lipídios (Szasz et al., 2013).

O PVAT é estruturalmente distinto da adventícia embora não exista barreira clara como uma lâmina elástica entre os dois (Figura 8), podendo, assim, se invaginar pela camada adventícia sugerindo que mediadores possivelmente secretados pelo PVAT possam alcançar as células musculares lisas e o endotélio vascular, participando da homeostase vascular (Majesky, 2015). Dependendo da região anatômica e do calibre do vaso sanguíneo, o PVAT pode ser mais abundante, como na aorta, discutivelmente separado do tecido adiposo circundante, como o PVAT coronariano dentro da gordura epicárdica, ou muitas vezes ausente, como na circulação cerebral ou microcirculação (Szasz et al., 2013).

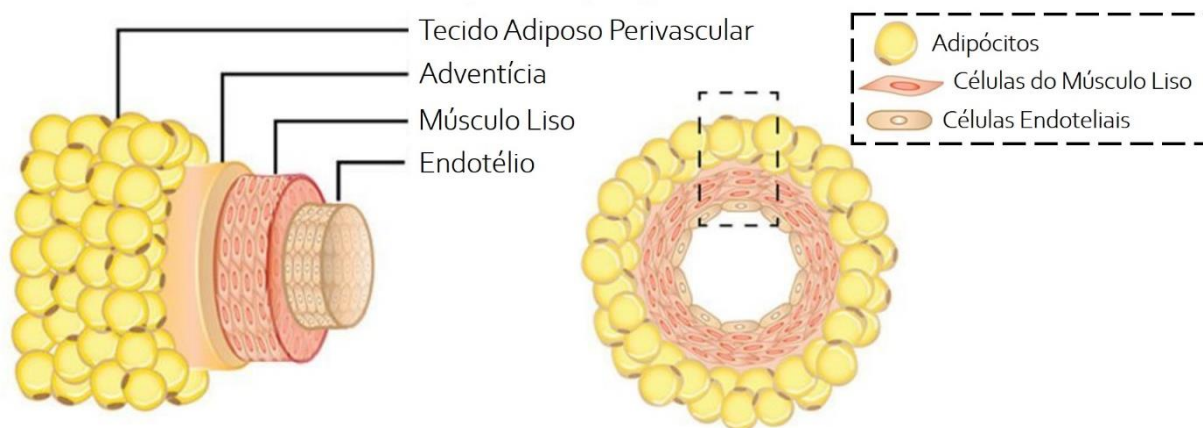


Figura 8 - Estrutura do vaso sanguíneo em camadas. Túnica íntima formada por camada única de células endoteliais e lâmina elástica interna; Túnica média formada por células do músculo liso e lâmina elástica externa; Túnica externa formada por células adventícias e pelo tecido adiposo perivascular. Adaptado de Huang Cao et al. (2017).

Estruturalmente, o PVAT é composto por adipócitos, células estromais, fibras nervosas, capilares e células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos (Szasz et al., 2013). Os adipócitos constituem a população de células mais abundante que compõe o PVAT. No entanto, é importante ressaltar que existem diferenças fenotípicas e funcionais entre os diferentes depósitos de PVAT (Gil-Ortega et al., 2015).

Em roedores, o PVAT é composto por dois tipos de tecido adiposo, o marrom e o branco. O tecido adiposo marrom é caracterizado por adipócitos de tamanho menor e multiloculares, citoplasma abundante contendo múltiplas pequenas vesículas lipídicas e numerosas mitocôndrias. A aparência marrom ou mais escura é devido à sua maior vascularização e suprimento sanguíneo (Frontini and Cinti, 2010). Sua função está relacionada à proteína mitocondrial UCP-1, expressa nesse tipo de célula, com função de produção de calor e dissipação de energia (Fedorenko et al., 2012). Por outro lado, o tecido adiposo branco é caracterizado por adipócitos de tamanho maior e uniloculares, contendo uma menor porção citoplasmática com uma única grande vesícula lipídica e pequenas mitocôndrias. A cor branca ou mais clara é devido à sua menor vascularização e irrigação sanguínea. Sua principal função é o depósito de lipídios para armazenamento de energia (Frontini and Cinti, 2010).

A Figura 9 ilustra a classificação do PVAT em roedores como tecido adiposo branco ou marrom de acordo com a sua localização anatômica. O PVAT das artérias

mesentérica, carótida e femoral é composto primordialmente pelo tecido adiposo branco, com adipócitos menos diferenciados, pouca vascularização, perfil específico de produção/secreção de adipocinas, infiltrado de macrófagos, células do sistema imunológico e fibroblastos. O PVAT da aorta torácica assemelha-se mais ao tecido adiposo marrom, com a presença de adipócitos multiloculares, alta abundância de mitocôndrias e expressão de genes exclusivamente expressos no tecido adiposo marrom. Já o PVAT da aorta abdominal compreende uma mistura entre os tecidos adiposos branco e marrom (Brown et al., 2014). Assim, podem existir diferentes perfis de vascularização, inervação e liberação de adipocinas dependendo do leito vascular (Szasz and Webb, 2012; Padilla et al., 2013; Gil-Ortega et al., 2015; Grigoras et al., 2019).

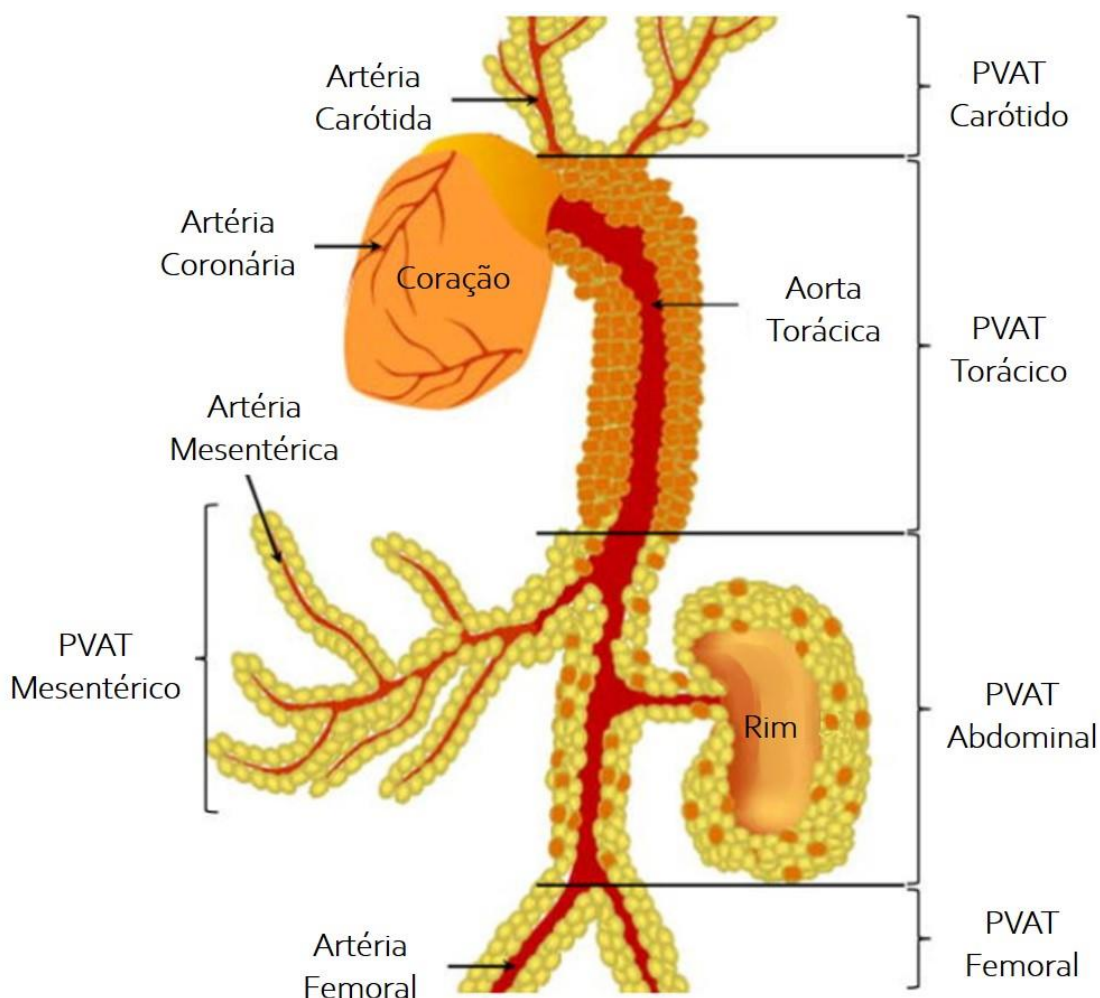


Figura 9 - Classificação do PVAT de roedores como tecido adiposo branco ou marrom de acordo com a sua localização anatômica. Adaptado de Brown et al. (2014).

Durante décadas, o endotélio foi o foco principal da pesquisa vascular tendo sua função amplamente reconhecida como órgão modulador do tônus vascular, responsável pela síntese e liberação tanto de fatores vasodilatadores quanto vasoconstritores derivados do endotélio (Rubanyi, 1991). No entanto, nos últimos anos, a importância de outras células vasculares tem sido cada vez mais reconhecida, incluindo células do músculo liso vascular (Lacolley et al., 2012), células da adventícia (Stenmark et al., 2013) e os adipócitos que compõem o PVAT (Xia and Li, 2017).

O PVAT era considerado pela biologia vascular um tecido com função apenas de suporte e proteção de estruturas adjacentes com funções adicionais de depósito de lipídios e termogênese, sendo rotineiramente removido em estudos *in vitro* a fim de simplificar os experimentos em vasos sanguíneos isolados (Gao, 2007; Agabiti-Rosei et al., 2018). Até que o papel do PVAT sobre a função vascular foi demonstrado pela primeira vez por Soltis e Cassis em 1991, quando foi observado que a presença do PVAT atenuava significativamente a contração vascular induzida por noradrenalina em aortas isoladas de ratos (Soltis and Cassis, 1991). A atenuação da vasoconstrição induzida por noradrenalina foi inicialmente atribuída à captação dessa monoamina pelo PVAT, interferindo na sua difusão para o tecido vascular.

Apesar dessas descobertas, a relevância do PVAT em desempenhar papel potencial na modulação da função vascular permaneceu então despercebida por quase dez anos. O interesse pelo PVAT foi resgatado por Lohn e colaboradores somente em 2002, quando demonstraram em uma elegante abordagem de bioensaio que a transferência do sobrenadante de adipócitos perivasculares em cultura, assim como a transferência da solução de preparações contendo o PVAT intacto, ao serem incubadas em preparações isentas de PVAT foram capazes de reproduzir essencialmente o mesmo efeito anticontrátil frente a diversos outros agonistas não sujeitos à captação, incluindo fenilefrina, angiotensina II e serotonina, refutando a hipótese de que o efeito anticontrátil do PVAT seria devido à sua barreira física capaz de impedir ou diminuir a difusão de moléculas exógenas para o tecido vascular (Lohn et al., 2002). Assim, o efeito anticontrátil do PVAT foi atribuído a mediadores denominados fatores de relaxamento derivados de adipócitos (*Adipocyte-Derived Relaxing Factor* - ADRF), em analogia ao fator de relaxamento

derivado do endotélio (*Endothelium-Derived Relaxing Factor* - EDRF) descrito na década de 1980 (Furchgott and Zawadzki, 1980).

Após essas descobertas, o PVAT emergiu como uma nova área de pesquisa em estudos vasculares e uma série de novas descobertas sobre a sua função foram relatadas, levando à ampla aceitação do PVAT como um importante órgão endócrino, biologicamente ativo, responsável por secretar diversas substâncias com efeitos parácrinos notáveis sobre os vasos sanguíneos (Gollasch and Dubrovská, 2004; Verlohren et al., 2004; Gao, 2007). A identidade dos fatores secretados pelo PVAT ainda segue em estudo, sendo provável uma combinação de diferentes moléculas vasodilatadoras e vasoconstritoras dependendo da espécie animal, do leito vascular, bem como do estímulo aplicado. Porém, de modo geral, pode-se afirmar que em condições fisiológicas o PVAT possui atividade modulatória negativa sobre a vasoconstrição de maneira benéfica para a manutenção do tônus vascular (Gao, 2007). O equilíbrio entre a secreção de mediadores vasodilatadores ou vasoconstritores pelo PVAT é extremamente importante para a manutenção do tônus vascular e o desequilíbrio dessa dupla regulação poderia contribuir para a disfunção vascular (Gao, 2007).

A Figura 10 ilustra moléculas biologicamente ativas secretadas pelo PVAT já identificadas, incluindo adipocinas como leptina e adiponectina, citocinas e quimiocinas como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1/CCL2), moléculas gasosas como óxido nítrico (NO) e sulfeto de hidrogênio (H₂S), componentes do sistema renina-angiotensina como angiotensina 1-7 (Ang 1-7) e angiotensina II (AngII), e espécies reativas de oxigênio como ânions superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Fesus et al., 2007; Gao et al., 2007; Galvez-Prieto et al., 2008; Malinowski et al., 2008; Fang et al., 2009; Lee et al., 2009; Ketonen et al., 2010a; Dashwood et al., 2011; Maenhaut and Van de Voorde, 2011). Contudo, os mecanismos responsáveis pela secreção desses diferentes mediadores pelo PVAT ainda não são totalmente compreendidos.

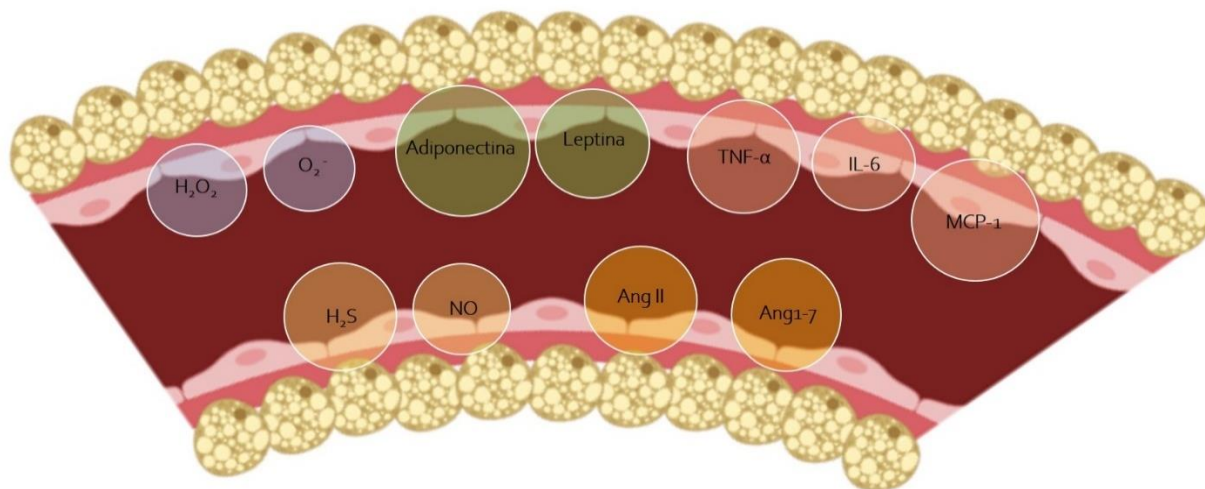


Figura 10 – Diferentes moléculas biologicamente ativas secretadas pelo PVAT com efeitos parácrinos sobre os vasos sanguíneos. Elaborado pela autora.

Uma vez que os efeitos anticontráteis do PVAT seriam, em condições fisiológicas, diretamente dependentes da sua massa (Verlohren et al., 2004; Gao et al., 2006), em um quadro de obesidade seria concebível que o efeito anticontrátil do PVAT estaria aumentado nessas circunstâncias (Fernández-Alfonso et al., 2013; Costa et al., 2018). Entretanto, diferentes estudos demonstraram que a obesidade desencadeia tanto alterações estruturais quanto funcionais no PVAT, levando à secreção desequilibrada a favor de mediadores contráteis, oxidativos e pró-inflamatórios, culminando na perda de suas propriedades anticontráteis, contribuindo para a disfunção vascular (Figura 11) (Gao et al., 2005a; Greenstein et al., 2009; Fernández-Alfonso et al., 2013; Owen et al., 2013; Xia and Li, 2017; Costa et al., 2018).

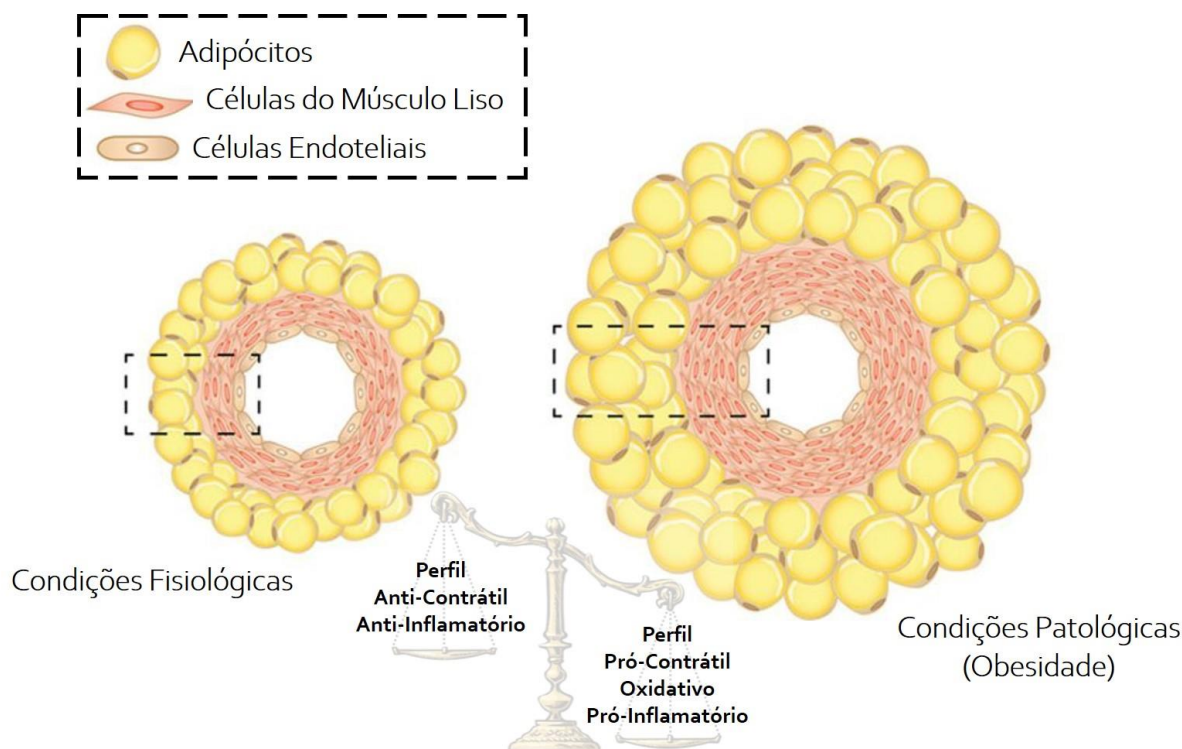


Figura 11 - Influência do PVAT sobre a homeostase vascular durante a obesidade. Adaptado de Huang Cao et al. (2017).

Os mecanismos que medeiam a perda do efeito anticonstrítil do PVAT durante a obesidade contribuindo para a disfunção vascular e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ainda estão em estudo. Evidências crescentes sugerem que a hiperativação do sistema renina-angiotensina (SRA) tecidual, presente no PVAT, desempenha papel central na patogênese de doenças cardiometabólicas (Mathai et al., 2011), uma vez que os componentes essenciais do SRA foram mostrados serem expressos no PVAT, incluindo angiotensinogênio, proteína de ligação à renina, enzima conversora de angiotensina (ECA) e os receptores peptidérgicos AT₁, AT₂ e Mas (Cassis, 2000; Galvez-Prieto et al., 2008; Nobrega et al., 2019). Além disso, como abordado anteriormente, a Ang II está entre os fatores vasoconstritores produzidos e secretados pelo PVAT, considerada o principal peptídeo efetor do SRA (Galvez-Prieto et al., 2008). Devido aos seus efeitos contráteis, oxidativos e pró-inflamatórios, a produção local de Ang II pelo PVAT possui impacto substancial na função e estrutura vascular, podendo desempenhar papel importante no desenvolvimento da disfunção vascular e doenças cardiovasculares associadas à obesidade (Cassis et al., 2008; Faria-Costa et al., 2014).

Outro mecanismo proposto para explicar a perda do efeito anticontrátil do PVAT durante a obesidade, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo está intimamente relacionado ao SRA (Ramalingam et al., 2017). A Ang II é um potente indutor de espécies reativas de oxigênio, como o O_2^- , que desempenham papel importante na modulação da contração vascular mediado pelo PVAT (Nguyen Dinh Cat et al., 2013). A secreção de Ang II pelo PVAT também tem sido demonstrada induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nos vasos sanguíneos (Cassis et al., 2008). Estudos relataram que os adipócitos que compõe o PVAT são fonte importante de O_2^- vascular, e a enzima NADPH oxidase, que representa a principal fonte de O_2^- na vasculatura, também foi mostrada ser expressa no PVAT (Furukawa et al., 2004; Gao et al., 2006). Além disso, o aumento da atividade de NADPH oxidase e da produção de ânions superóxido foi demonstrado em um modelo de obesidade induzido por dieta (Ketonen et al., 2010b).

Diferentes citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias são sensíveis ao status redox, relacionando o estresse oxidativo a processos inflamatórios. Assim, o estresse oxidativo durante a obesidade tem sido correlacionado ao aumento de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no PVAT, incluindo leptina, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17, RANTES, MCP-1, CXCL-3 e CXCL-10 (Chatterjee et al., 2009). Além disso, o aumento na produção de espécies reativas também tem sido correlacionado ao aumento da atividade e expressão da enzima ciclooxigenase (COX), responsável pela produção de prostaglandinas, como a prostaglandina F 2α (PGF 2α) e o tromboxano A $_2$ (TxA $_2$), envolvidos na vasoconstrição e no remodelamento da parede vascular, bem como na agregação plaquetária e trombose (Ozen et al., 2013; Hernanz et al., 2014). Assim, conforme abordado anteriormente, a obesidade está associada a um estado de inflamação crônica de baixo grau que pode ser detectado tanto sistemicamente quanto em tecidos específicos, como o PVAT, que adquire um perfil pró-inflamatório, contribuindo para a perda do seu efeito anticontrátil durante a obesidade (Lumeng et al., 2007; Nosalski and Guzik, 2017).

Em conjunto, a hiperativação do SRA, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e a influência predominantemente pró-inflamatória do PVAT sobre o tônus vascular, podem ser atribuídos à perda do seu efeito anticontrátil durante a obesidade, contribuindo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Contudo, ainda há muito a ser investigado para a compreensão dos mecanismos envolvidos na secreção de mediadores vasodilatadores e vasoconstritores em condições fisiológicas e suas alterações em condições patológicas, como a obesidade, levando ao desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção ou tratamento da disfunção vascular e doenças cardiovasculares associada à obesidade.

Dessa forma, sabendo-se que atualmente a obesidade já afeta mais de um terço da população mundial estando entre as causas mais importantes de doenças cardiovasculares, e que a dieta de cafeteria reflete a variedade de alimentos processados altamente calóricos de fácil acesso nas sociedades ocidentais, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade e desordens metabólicas, é necessária a melhor compreensão de como a obesidade induzida pela dieta de cafeteria afetaria o sistema cardiovascular e o perfil vasoativo do PVAT, fornecendo alvos para possíveis intervenções farmacológicas. A hipótese desse trabalho é que a dieta de cafeteria irá provocar alterações metabólicas que possam se relacionar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares relacionadas à obesidade, como insuficiência cardíaca, disfunção endotelial e aumento da contratilidade vascular, além de induzir a produção de fatores vasoconstritores, oxidativos e inflamatórios pelo PVAT por meio da hiperativação do sistema renina-angiotensina, contribuindo para a disfunção vascular.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da dieta de cafeteria sobre o sistema cardiovascular, bem como sua influência no perfil vasoativo do PVAT, identificando os mecanismos de ação relacionados às alterações observadas.

2.2 Objetivos Específicos

Investigar se a dieta de cafeteria:

- ✓ Provoca alterações metabólicas que possam se relacionar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares associadas à obesidade;
- ✓ Desencadeia alterações cardíacas a nível celular e funcional;
- ✓ Induz alterações na contratilidade ou no relaxamento vascular;
- ✓ Altera o perfil vasoativo do PVAT;

Verificar se as alterações observadas são reversíveis ou modificáveis com o tratamento dietético, alternando a dieta de cafeteria pela dieta padrão para roedores.

3 Materiais e Métodos

3.1 Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no Laboratório de Farmacologia Vascular sob condições controladas de temperatura e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h), com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), submetidos à análise do Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) da UFMG e aprovados sob o número de protocolo 383/2016.

Os animais foram divididos randomicamente em dois grupos: grupo controle e grupo CAF. O grupo controle recebeu dieta padrão para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1, Nuvital, Colombo/PR). Já o grupo CAF recebeu dieta hipercalórica do tipo cafeteria contendo pellets salgados (25% batata frita tipo chips industrializada, 25% amendoim, 30% manteiga sem sal e 20% ração padrão para roedores) e pellets doces (25% leite condensado, 25% biscoito wafer de chocolate, 30% amendoim e 20% ração padrão para roedores), com livre acesso à água contendo açúcar refinado (105 mg/mL) (Oliveira et al., 2017). A Tabela 1 apresenta a composição nutricional das dietas controle e cafeteria calculada de acordo com os fabricantes dos produtos. As dietas foram fornecidas por 4 semanas, a partir de 8 semanas de idade, de forma que os animais dos grupos controle e CAF tivessem 12 semanas de idade no momento da eutanásia (Figura 12).

Tabela 1 - Composição Nutricional das Dietas Controle e Cafeteria

COMPOSIÇÃO	DIETA CONTROLE	DIETA DE CAFETERIA
	kcal%	kcal%
PROTEÍNAS	31,1	11
CARBOIDRATOS	65,8	31
LIPÍDIOS	3,1	58
KCAL/G	4,0	5,8

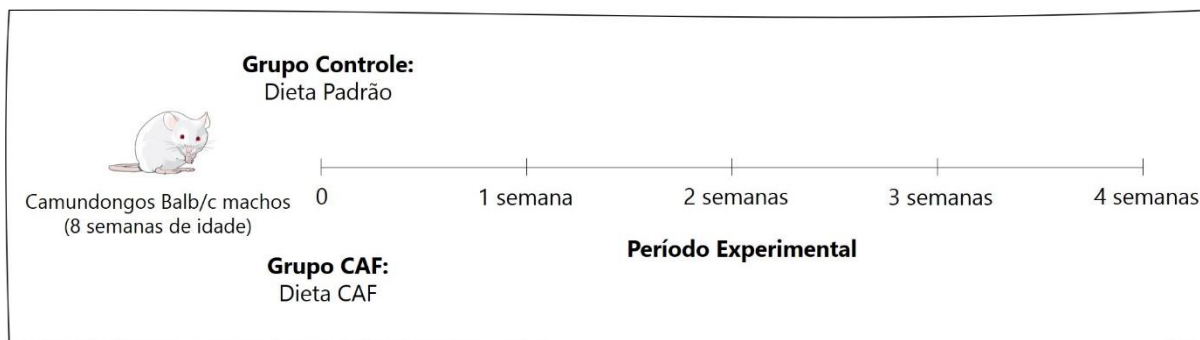


Figura 12 - Representação esquemática do delineamento experimental. Elaborado pela autora.

3.2 Peso Corporal, Consumo de Ração e Índice de Adiposidade

O peso corporal e o consumo de ração dos animais foram avaliados semanalmente durante as 4 semanas de estudo. Amostras dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico dos grupos controle e CAF foram coletadas e pesadas no momento da eutanásia para a avaliação do índice de adiposidade calculado de acordo com a equação abaixo (Oliveira et al., 2017).

$$\text{Índice de Adiposidade (\%)} = \frac{\sum \text{Peso dos Tecidos Adiposos}}{\text{Peso do Animal}} \times 100$$

3.3 Registro da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada em mmHg semanalmente utilizando o método não invasivo da pletismografia de cauda (Pletismógrafo LE5001; Panlab®, Barcelona, Espanha). Após o pré-condicionamento na câmara de contenção, foram obtidas dez leituras consecutivas de cada animal dos grupos controle e CAF, e a medida individual da pressão arterial foi calculada pela média das leituras obtidas.

3.4 Testes de Tolerância Oral à Glicose e Sensibilidade à Insulina

Ao final da 4ª semana de dieta foram realizados os testes de tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina, respeitando um intervalo de 3 dias entre cada um dos testes. Para o teste de tolerância oral à glicose os animais dos grupos controle e CAF foram deixados em jejum durante 6 h e, após esse período, a glicose foi administrada via oral por gavagem (2mg/g de peso corporal). Os níveis de glicose foram monitorados a partir de amostras de sangue da cauda nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose utilizando o glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). O teste de sensibilidade à insulina foi realizado após injeção intraperitoneal de insulina (0,75 U/kg de peso corporal) em

animais dos grupos controle e CAF em estado alimentado. Amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de insulina para a medida dos níveis de glicose no sangue.

3.5 Determinação dos Parâmetros Séricos

Os níveis séricos de glicose, colesterol e triglicerídeos em jejum foram avaliados utilizando kits enzimáticos colorimétricos (KATAL, Belo Horizonte, MG, Brasil) e determinados por espectrofotometria.

3.6 Determinação de Adipocinas no Soro por ELISA

A quantificação das adipocinas leptina, adiponectina, quemerina e resistina no soro foram determinadas pelo ensaio de ELISA (R&D Systems Europe Ltd., Abington, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações das adipocinas foram avaliadas em diluição 1:2 para leptina, 1:12000 para adiponectina, 1:500 para quemerina, 1:100 para resistina diluídas em PBS (Phosphate Buffered Saline) contendo 0,1% de BSA (Bovine Serum Albumin). Foram adicionados 100 µL de solução por poço na concentração adequada do anticorpo de captura específico de cada adipocina. A placa contendo a solução com o anticorpo de captura permaneceu à temperatura de 4°C em local úmido e protegido da luz até o dia seguinte, após o período, cada poço foi lavado 3 vezes com solução PBS/Tween 0,1%. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA) que permaneceu na placa por 1 hora. Ao término do tempo, as placas foram novamente lavadas para a adição das amostras e os padrões das adipocinas a partir de concentrações decrescentes, sendo assim formada a curva padrão. As placas foram incubadas até o dia seguinte nas mesmas condições anteriores. As placas foram lavadas e adicionado 100 µL da solução com anticorpo de detecção em cada poço das placas. Cada placa foi incubada em temperatura ambiente por duas horas. Transcorrido este período e após lavagem, foi adicionada à cada placa, solução contendo estreptavidina. Após 30 minutos, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂, Merck). A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria a 490 nm.

3.7 Peso dos Órgãos

Logo após a eutanásia, o coração e o fígado foram cuidadosamente retirados para pesagem em balança analítica. A tíbia direita foi dissecada para medida do comprimento, utilizada como correção do peso dos órgãos.

3.8 Extração da Gordura Hepática

A gordura total do fígado foi extraída pelo método de Folch (Folch et al. 1957). O fígado foi homogeneizado com uma solução composta por clorofórmio:metanol (2:1) para extrair os lipídeos das amostras. Após a extração, a solução foi filtrada e misturada com solução salina a 0,9%. A fase superior foi aspirada e uma alíquota da fase inferior foi transferida para um recipiente pré-pesado. O colesterol total e os triglicerídeos do fígado foram medidos por kits enzimáticos (KATAL, Belo Horizonte, MG) após a dissolução em isopropanol do extrato prévio de lipídeos do fígado.

3.9 Análise Histológica

Cuidadosamente o tecido adiposo epididimal e o fígado dos grupos controle e CAF foram isolados e fixados em paraformaldeído 7% por 48 h com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação realizada em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e absoluto I, II e III) permanecendo por período de 30 minutos em cada solução. Em seguida, foi realizada a diafanização em que os tecidos foram banhados em xilol I, II e III, permanecendo por período de 20 minutos em cada solução e, logo após, os tecidos foram impregnados com parafina durante 1 h e incluídos na mesma. Cortes de 5 µm de espessura foram desparafinizados, reidratados e submetidos à coloração usual Hematoxilina e Eosina para visão geral e análise morfológica. Sessões do fígado e do tecido adiposo epididimal foram fotografadas usando câmera digital acoplada a um microscópio (200x).

3.10 Eletrocardiograma

Os eletrocardiogramas (ECG) foram realizados em animais dos grupos controle e CAF anestesiados com isoflurano (1-2%) por 10 minutos, utilizando um eletrocardiógrafo não invasivo de 6 canais (ECG-PC versão 2.07, Tecnologia Eletrônica Brasileira - TEB, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os parâmetros de ECG foram retirados da derivação periférica II, a 50 mm/s, e 2 N. O eixo cardíaco foi calculado a partir de I e AvF.

3.11 Função Cardíaca

Para avaliar a função cardíaca *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com fluxo constante. Os animais foram eutanasiados por decaptação 10 minutos após a injeção intraperitoneal de 50 µl de heparina (5.000 UI/mL). Após a abertura da cavidade torácica, os corações foram retirados e colocados em uma placa de petri contendo solução de Krebs (em mmol/L: NaCl 113,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,1; MgCl₂.6H₂O 1,1; NaHCO₃ 22,0; glicose 11,0; CaCl₂ 1,35) com pH estável de 7,4 a 4°C. A solução de Krebs deve ser fria para diminuir o metabolismo do miocárdio e o consumo de O₂ durante o tempo entre a eutanásia e a canulação da aorta. Em seguida, a aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão que leva a solução de Krebs às artérias coronarianas. Os corações foram perfundidos retrogradamente com fluxo constante de 3 mL/min com uma pressão de 60 a 80 mmHg de solução de Krebs, aerada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂) a uma temperatura de 36°C. Para analisar os parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo, o átrio esquerdo foi retirado e um balão de látex customizado conectado a um transdutor de pressão e um amplificador (AVS projects, SP, Brasil) foi introduzido até a câmara do ventrículo esquerdo. Depois de introduzido, o balão foi inflado para ajustar a pressão sistólica do ventrículo esquerdo em aproximadamente 100 mmHg (Kaakinen et al., 2017). O transdutor de pressão acoplado ao balão registrou a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e as derivadas dp/Dt máxima e mínima. A PDVE foi calculada pela subtração da pressão sistólica do ventrículo esquerdo pela pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Após o período de estabilização de 30 minutos, os corações foram estimulados farmacologicamente com isoprenalina (10⁻¹³ mol/L - 3x10⁻⁵ mol/L) e as curvas concentração-resposta foram analisadas.

3.12 Contratilidade dos Cardiomiócitos

Os cardiomiócitos foram isolados de acordo com a metodologia descrita por Guatimosim et al., (2002). Os animais dos grupos controle e CAF foram eutanasiados por decaptação e o coração foi rapidamente removido e perfundido retrogradamente via método de Langendorff com solução de Tyrode modificada livre de Ca²⁺ (em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 5,4; HEPES 25,0; MgCl₂ 0,5; NaH₂PO₄ 0,33; glicose 22,0 e insulina 100 U/mL; pH=7,4). Posteriormente, o coração foi perfundido

com solução de Tyrode modificada livre de Ca^{2+} contendo $50 \mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 e colagenase (tipo 2 – 1 mg/mL) durante 15 minutos. Após essa etapa de digestão enzimática, as câmaras ventriculares foram separadas e submetidas à digestão mecânica, sendo em seguida filtrado para remover o tecido que não foi digerido. A concentração extracelular de Ca^{2+} foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a $500 \mu\text{mol/L}$ ao final do processo. Logo após, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em solução de Tyrode. Uma câmera CMOS digital de alta velocidade (SILICON VIDEO ® 642M, EPIX, Inc) foi acoplada em um microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-e contendo uma objetiva de 40x (Nikon Japan, abertura numérica de 0.55 e distância de trabalho de 2.1 mm). Na platina do microscópio, foi adicionada uma incubadora (modelo ChamlideIC-CU:109, Live Cell Instrument, Nowan-gu, Korea) que mantém uniforme os níveis de temperatura (37°C) e umidade (60%). Os cardiomiócitos adultos foram estimulados eletricamente por meio de eletrodos de platina (1Hz, 30V) com pulsos de voltagem de duração de 5 ms. A sequência de imagens foi registrada durante 1 minuto pela câmera, com uma taxa de captura de 200 Hz, gerando um total de 12.000 imagens, com uma resolução de 640×200 pixels ($0.2375 \mu\text{m/pixel}$) e com uma profundidade de 8 bits. Para a obtenção dos parâmetros de contratilidade, foi utilizada a metodologia descrita em Scalzo *et al* 2017 (Dissertação de Mestrado). Brevemente, a velocidade de contratilidade foi obtida por meio do fluxo ótico calculado a partir de todos os pontos (pixels) em cada imagem. Posteriormente, a velocidade final foi obtida pela média da magnitude de movimento do cardiomiócito de cada imagem e plotado em um gráfico de velocidade por tempo.

3.13 Reatividade Vascular

Os animais dos grupos controle e CAF foram submetidos à eutanásia por decapitação e a porção torácica da aorta foi cuidadosamente isolada e transferida para uma placa de Petri contendo solução fisiológica de Krebs-Henseleit modificado com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 135,0; KCl 5,0; KH_2PO_4 1,17; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,4; NaHCO_3 20,0; glicose 11,0. A aorta foi seccionada em quatro anéis de aproximadamente 3 mm de comprimento cada e, em metade dos anéis o tecido adiposo perivascular foi completamente retirado, enquanto a outra metade foi mantida intacta. Ganchos de metal foram inseridos no lúmen do vaso de modo que permanecessem paralelos. Posteriormente, o sistema foi montado em banho para

órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit modificado mantido a temperatura de 37°C com pH estável de 7,4 e aerado com mistura carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂ (White Martins, Brasil).

Curvas de tensão foram realizadas para determinar a melhor tensão isométrica para a estabilização das aortas dos grupos controle e CAF. As preparações foram mantidas em repouso por 60 minutos sob diferentes valores de tensão 0,9 mN (0,1g), 1,9 mN (0,2g), 2,9 mN (0,3g), 3,9 mN (0,4g), 4,9 mN (0,5g), 5,9 mN (0,6g) ou 6,9 mN (0,7 g) e estimuladas com cloreto de potássio (0,09 mol/L) em cada uma delas até atingirem o platô de vasoconstrição. Após a análise da melhor resposta de contração vascular entre as tensões isométricas avaliadas, a tensão 3,9 mN (0,4 g) obteve a melhor resposta registrada para os grupos controle e CAF, sendo a tensão escolhida para os protocolos experimentais de reatividade vascular.

As próximas preparações foram então mantidas sob tensão basal de 3,9 mN (0,4 g) e, após o período de 60 minutos de estabilização, os anéis de aorta foram estimulados com cloreto de potássio (0,09 mol/L) com o objetivo de determinar se as preparações estavam viáveis. Posteriormente, os anéis de aorta foram estimulados com fenilefrina (EC₅₀: 10⁻⁷ mol/L) e a presença do endotélio funcional foi verificada pela adição de acetilcolina (EC₅₀: 10⁻⁶ mol/L). A integridade da camada endotelial foi considerada em preparações que apresentaram um mínimo de 80% de relaxamento para acetilcolina. A lesão das células endoteliais foi confirmada em preparações que apresentaram um máximo de 20% de relaxamento para acetilcolina, sem prejudicar a maquinaria contrátil.

Para avaliar o efeito da dieta de cafeteria na contratilidade vascular, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina (PE: 10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L) em aortas torácicas com endotélio íntegro na presença e ausência do PVAT nos grupos controle e CAF. Para avaliar o efeito da dieta de cafeteria no relaxamento vascular, as aortas foram pré-contraídas com PE (10⁻⁷ mol/L) e curvas cumulativas concentração-resposta para acetilcolina (ACh: 10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L) foram realizadas na presença e ausência do PVAT nos grupos controle e CAF.

Após a caracterização do efeito da dieta de cafeteria sobre o perfil vasoconstritor e vasodilatador da aorta na presença ou ausência do PVAT, as seguintes possíveis vias de sinalização envolvidas foram avaliadas.

ETAPA I

3.14 Mecanismos de Ação Envolvidos na Hiporresponsividade Aórtica

Para os experimentos a seguir, foram utilizadas aortas torácicas sem PVAT, com o endotélio vascular íntegro ou não. Os protocolos tiveram como objetivo investigar se a via de sinalização: *receptor da leptina - PI3K – AKT – NOS* estaria envolvida na hiporresponsividade aórtica observada no grupo CAF na ausência do PVAT.

3.14.1 Silenciamento do Receptor da Leptina

Um dos métodos baseados em mRNA para silenciamento de genes é a utilização de agentes *antisense*. Essa estratégia consiste em introduzir um oligonucleotídeo complementar ao mRNA-alvo dentro de uma determinada célula, por exemplo. O híbrido DNA-RNA formado pode bloquear a ligação do mRNA ao ribossomo ou ativar a degradação do mRNA-alvo por RNase (Barbosa and Lin, 2004).

Para verificar a participação da ativação do receptor da leptina na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, a técnica de antisense oligodesoxinucleotídeos (AS-ODN) *in vivo* foi utilizada para a redução da expressão protéica do receptor da leptina (ObR *knockdown*). Para tal, foram utilizadas sequências de 23 bases marcadas com fosforotiolato para evitar a degradação por nucleases endógenas. O AS-ODN fosforotioado foi construído com base na sequência encontrada em camundongos. A seguinte sequência específica para o receptor da leptina foi utilizada: 5' ACA CTG TTA ATT TCA CAC CAG AG 3' adquirido na Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brasil).

A sequência AS-ODN foi dissolvida em 200 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) para uma concentração de 1 nmol/100µL. Os animais foram previamente anestesiados por injeção intraperitoneal com 80 µL de uma mistura contendo salina 0,9%, quetamina 10% e xilazina 2% na proporção 4:3:1, respectivamente. Posteriormente, foram administrados 2 nmoles do AS-ODN por via intravenosa por

meio da veia peniana 24 h antes do experimento de reatividade vascular. Após 24 h da administração do AS-ODN, a aorta foi cuidadosamente isolada e, decorrido o período de estabilização, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

3.14.2 Ativação da Via PI3K-AKT-NOS

Visando confirmar o envolvimento da via de sinalização *PI3K-AKT-NOS* na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, anéis de aorta foram incubados com o inibidor da enzima PI3K, LY294,002 (10^{-6} mol/L), ou com o inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), L-NAME (10^{-4} mol/L), durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

Uma vez confirmada a participação da NOS na hiporresponsividade aórtica induzida pela dieta de cafeteria, o envolvimento de suas isoformas foi avaliado. Para isso, anéis de aorta foram incubados com o inibidor seletivo da isoforma neuronal da NOS, 7Ni (10^{-4} mol/L), ou com o inibidor seletivo da isoforma induzida da NOS (iNOS), 1400W (10^{-5} mol/L), durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

3.14.3 Silenciamento da Isoforma Endotelial da NOS

Para verificar a participação da isoforma endotelial da NOS (eNOS) na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, a técnica de antisense oligodesoxinucleotídeos (AS-ODN) *in vivo* foi utilizada para a redução da expressão protéica da eNOS (eNOS *knockdown*). Para tal, foram utilizadas sequências de 19 bases marcadas com fosforotiolato para se evitar a degradação por nucleases endógenas. O AS-ODN fosforotioado foi construído com base na sequência encontrada em camundongos. A seguinte sequência específica para a eNOS foi utilizada: 5' CTC TTC AAG TTG CCC ATG T 3' (número de acesso Genbank NM_008713) adquirido na Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brasil).

A sequência AS-ODN foi dissolvida em 200 μ L de solução salina estéril (NaCl 0,9%) para uma concentração de 1 nmol/100 μ L. Os animais foram previamente anestesiados por injeção intraperitoneal com 80 μ L de uma mistura contendo salina

0,9%, quetamina 10% e xilazina 2% na proporção 4:3:1, respectivamente. Posteriormente, foram administrados 2 nmoles do AS-ODN por via intravenosa por meio da veia peniana 24 h antes do experimento de reatividade vascular. Após 24 h da administração do AS-ODN, a aorta foi cuidadosamente isolada e, decorrido o período de estabilização, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

3.14.4 Participação do Endotélio Vascular

Com o objetivo de analisar se o endotélio vascular estaria envolvido na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, a camada endotelial foi cuidadosamente removida e, decorrido o período de estabilização, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

3.14.5 Participação do Peróxido de Hidrogênio

Visando confirmar a participação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, anéis de aorta foram incubados durante 30 minutos com catalase (300 U/mL), enzima responsável pela metabolização de H_2O_2 . Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

Para analisar a participação do peróxido de hidrogênio em conjunto com o óxido nítrico na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, anéis de aorta foram incubados concomitantemente com catalase (300 U/mL) e L-NAME (10^{-4} mol/L) durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

3.14.6 Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico e Peróxido de Hidrogênio

A técnica de fluorescência foi utilizada para a avaliação dos níveis de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Para isso, a porção torácica da aorta foi cuidadosamente isolada e embebida em composto OCT (resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato; Tissue-Tek; Qaigen, Hilden, Alemanha), acondicionadas à $-20^{\circ}C$. As aortas congeladas foram então seccionadas em cortes de 20 μ m de espessura e aderidas a

lâminas de vidro previamente gelatinizadas. (Gelatinização: As lâminas foram lavadas por 20 minutos em água corrente. Em seguida, cada lâmina foi lavada novamente com jatos de água e secas à temperatura ambiente. Para o preparo da gelatina, foram aquecidos 2 L de água, sem ferver, temperatura aproximada de 60° a 70° C. Em um homogeneizador aquecido, foi adicionado 1 g de sulfato de cromo e, em seguida, 10 g de gelatina microbiológica. As lâminas foram adicionadas em cestas que as deixaram separadas e essas foram submersas em um recipiente contendo a gelatina pronta por 30 minutos. As lâminas foram retiradas da gelatina e acondicionadas à temperatura ambiente por 24 h até secarem).

As sondas DAF-2DA e DCF-DA (2.5 $\mu\text{mol/L}$) foram aplicadas aos cortes de maneira isolada para avaliar *in situ* a formação de NO e H₂O₂, respectivamente. As lâminas foram incubadas, protegidas da luz, em estufa a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com PBS, protegidas da luz, em estufa a 37°C durante 10 minutos.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A2, onde a sonda DAF-2DA foi excitada a um comprimento de onda 488 nm com espectro de emissão em 519 nm, e a sonda DCF-DA foi excitada a um comprimento de onda 590 nm com espectro de emissão em 618 nm. A aquisição das imagens foi realizada sob os padrões de calibragem idênticos para os grupos controle e CAF. A análise quantitativa das imagens foi realizada por meio do software ImageJ (1.45) e expressa como intensidade de fluorescência das sondas em questão (% de emissão por núcleos celulares).

3.14.7 Imunomarcção das Isoformas Endotelial, Induzida e Neuronal da NOS

A técnica de imunofluorescência foi utilizada no intuito de identificar a localização das isoformas da NOS em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Para isso, as aortas torácicas foram cuidadosamente isoladas e acondicionadas diretamente em OCT (resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato; Tissue-Tek; Qaigen, Hilden, Alemanha) e, posteriormente, acondicionadas à -20°C. Depois de congelados, os blocos foram cortados em criostato com espessura de 0,10 μm e acondicionados em lâminas previamente gelatinizadas.

Para a realização da imunolocalização das isoformas da NOS, os cortes foram fixados com acetona PA gelada por 15 minutos seguido por 3 lavagens a cada

5 minutos com PBS no intuito de retirar toda a acetona. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução permeabilizante (0,1% de Triton X-100, BSA 4% em PBS 1x) por um período de 1 h em temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-eNOS 1:100; policlonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-iNOS 1:100; policlonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-nNOS 1:100; policlonal feito em coelho; Santa Cruz Biotechnology Inc.) *overnight* em geladeira a 4°C. Após lavagem com permeabilizante seguida de PBS, os cortes foram incubados com anticorpos secundários específicos marcados com fluoróforo Alexa-488 ou Alexa-568 (1:500; Thermo Scientific) por 2 h a temperatura ambiente. Após lavagens com solução permeabilizante e PBS, as lâminas receberam um meio de montagem e foram cobertos com lamínula.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A2, com excitação a 488 nm e espectro de emissão em 519 nm. A aquisição das imagens foi realizada sob os padrões de calibragem idênticos para os grupos controle e CAF. A análise quantitativa das imagens foi realizada por meio do software ImageJ (1.45) e expressa como intensidade de fluorescência da sonda em questão (% de emissão por núcleos celulares).

ETAPA II

3.15 Mecanismos de Ação Envolvidos no Perfil Vasoconstritor do PVAT Induzido pela Dieta de Cafeteria

Para os experimentos a seguir, foram utilizadas aortas torácicas com e sem PVAT, com o endotélio vascular íntegro. Os protocolos tiveram como objetivo investigar se a via de sinalização: *sistema renina-angiotensina – ânions superóxido – enzima ciclooxygenase – prostanoídes vasoconstritores* estaria envolvida no perfil vasoconstritor observado em aortas com PVAT do grupo CAF.

3.15.1 Ativação do Sistema Renina-Angiotensina

Para verificar o envolvimento da ativação do sistema renina-angiotensina no perfil vasoconstritor do PVAT induzido pela dieta de cafeteria, anéis de aorta foram incubados com o inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), captopril (10^{-5} mol/L), durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas

cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

Uma vez confirmada a participação da ECA no perfil vasoconstritor do PVAT induzido pela dieta de cafeteria, a ativação do receptor AT_1 foi avaliada. Para isso, anéis de aorta foram incubados com o antagonista seletivo do receptor AT_1 , losartana (10^{-5} mol/L), durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

3.15.2 Participação da Enzima NADPH Oxidase e Produção de Ânions Superóxido

Visando confirmar a participação de enzima NADPH oxidase no perfil vasoconstritor do PVAT induzido pela dieta de cafeteria, anéis de aorta foram incubados com apocinina (10^{-4} mol/L) durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

Para analisar a participação de ânions superóxido no perfil vasoconstritor do PVAT induzido pela dieta de cafeteria, anéis de aorta foram incubados com tiron (10^{-3} mol/L) durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

3.15.3 Ativação da Enzima Ciclooxigenase e Produção de Mediadores Vasoconstritores

Com o objetivo de analisar se a ativação da enzima ciclooxigenase (COX) estaria envolvida no perfil vasoconstritor do PVAT induzido pela dieta de cafeteria, anéis de aorta foram incubados com o inibidor não seletivo da COX, ibuprofeno (10^{-5} mol/L), durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

Uma vez confirmada a participação da COX no perfil vasoconstritor do PVAT induzido pela dieta de cafeteria, o envolvimento de suas isoformas foi avaliado. Para isso, anéis de aorta foram incubados com o inibidor seletivo da COX_1 , mofezolac (10^{-6} mol/L), ou com o inibidor seletivo da COX_2 , nimesulida (10^{-6} mol/L), durante 30 minutos. Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

Posteriormente, para avaliar a participação dos prostanóides vasoconstritores prostaglandina F_{2α} e tromboxano no perfil vasoconstritor do PVAT induzido pela dieta de cafeteria, anéis de aorta foram incubados durante 30 minutos com o antagonista seletivo do receptor de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), AH6809 (10⁻⁵ mol/L), ou com o antagonista seletivo do receptor de tromboxano A₂ (TxA₂), seratrodate (10⁻⁶ mol/L). Decorrido o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L) foram realizadas.

3.15.4 Determinação dos Níveis de Ânions Superóxido

A técnica de fluorescência foi utilizada para a avaliação dos níveis de ânions superóxido nas aortas dos grupos controle e CAF. Para isso, a porção torácica da aorta foi cuidadosamente isolada e embebida em composto OCT (resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato; Tissue-Tek; Qaigen, Hilden, Alemanha), acondicionadas à -20°C. As aortas congeladas foram então seccionadas em cortes de 20 μm de espessura e aderidas a lâminas de vidro previamente gelatinizadas.

A sonda DHE (1 μmol/L) foi aplicada aos cortes de maneira isolada para avaliar in situ a formação de O₂⁻. As lâminas foram incubadas, protegidas da luz, em estufa a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com PBS, protegidas da luz, em estufa a 37°C durante 10 minutos.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A2, onde a sonda DHE foi excitada a um comprimento de onda 488 nm com espectro de emissão em 519 nm. A aquisição das imagens foi realizada sob os padrões de calibragem idênticos para os grupos controle e CAF. A análise quantitativa das imagens foi realizada por meio do software ImageJ (1.45) e expressa como intensidade de fluorescência da sonda em questão (% de emissão por núcleos celulares).

3.15.5 Imunomarcção das Isoformas COX₁ e COX₂

A técnica de imunofluorescência foi utilizada no intuito de identificar a localização das isoformas da COX em aortas com PVAT dos grupos controle e CAF. Para isso, as aortas torácicas foram cuidadosamente isoladas e acondicionadas diretamente em OCT (resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato; Tissue-Tek; Qaigen, Hilden, Alemanha) e, posteriormente, acondicionadas

à -20°C. Depois de congelados, os blocos foram cortados em criostato com espessura de 0,10 µm e acondicionados em lâminas previamente gelatinizadas.

Para a realização da imunolocalização das isoformas da COX, os cortes foram fixados com acetona PA gelada por 15 minutos seguido por 3 lavagens a cada 5 minutos com PBS no intuito de retirar toda a acetona. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução permeabilizante (0,1% de Triton X-100, BSA 4% em PBS 1x) por um período de 1 h em temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-COX₁ 1:100; policlonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology Inc.) e anti-COX₂ 1:100; policlonal feito em camundongo; Santa Cruz Biotechnology Inc.) *overnight* em geladeira a 4°C. Após lavagem com permeabilizante seguida de PBS, os cortes foram incubados com anticorpos secundários específicos marcados com fluoróforo Alexa-488 ou Alexa-568 (1:500; Thermo Scientific) por 2 h a temperatura ambiente. Após lavagens com solução permeabilizante e PBS, as lâminas receberam um meio de montagem e foram cobertos com lamínula.

As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager A2, com excitação a 488 nm e espectro de emissão em 519 nm. A aquisição das imagens foi realizada sob os padrões de calibragem idênticos para os grupos controle e CAF. A análise quantitativa das imagens foi realizada por meio do software ImageJ (1.45) e expressa como intensidade de fluorescência da sonda em questão (% de emissão por núcleos celulares).

3.16 Tratamento Dietético

Para avaliar se o tratamento dietético reverte as principais alterações metabólicas e cardiovasculares induzidas pela dieta de cafeteria, os animais foram divididos randomicamente em três grupos: grupo controle, grupo CAF e grupo CAF-tratado. O grupo controle recebeu dieta padrão para roedores de laboratório por 8 semanas consecutivas. Já o grupo CAF recebeu dieta hipercalórica do tipo “cafeteria” com livre acesso à água contendo açúcar refinado por 8 semanas consecutivas, enquanto o grupo CAF-tratado recebeu dieta do tipo “cafeteria” com livre acesso à água contendo açúcar refinado por 4 semanas consecutivas e, posteriormente, alterando a dieta para a dieta padrão para roedores por mais 4 semanas (Figura 13).

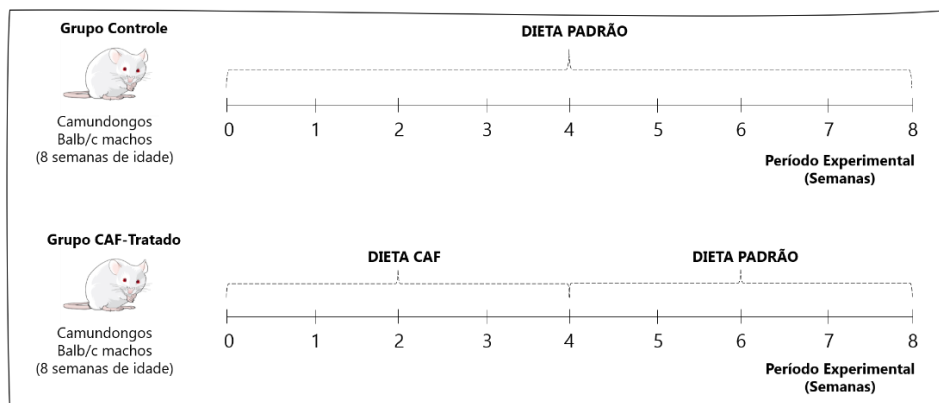


Figura 13 - Representação esquemática do delineamento experimental para o tratamento dietético. Elaborado pela autora.

Após o período de 8 semanas de estudo, os animais dos grupos controle, CAF e CAF-tratado foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após a injeção intraperitoneal de 50 μ l de heparina (5.000 UI/mL) e novamente foram avaliados o índice de adiposidade corporal, a função cardíaca *ex vivo* por meio da técnica de Langendorff, a contração vascular (PE: 10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L) em aortas torácicas com endotélio íntegro na presença e ausência do PVAT, seguindo a descrição de cada uma das técnicas citadas anteriormente.

3.17 Análise Estatística

Os gráficos e análises foram realizados no GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As determinações de EC₅₀ (concentração que produz 50% da resposta máxima) e de efeito máximo (Emax) foram realizadas utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados (Meddings et al., 1989). Para a análise da potência, foi utilizado o valor de pD₂ (-log EC₅₀). Os valores de pD₂ e Emax foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Após verificar a aderência à distribuição normal, a significância estatística foi determinada utilizando o teste t Student para comparações entre dois grupos ou ANOVA de duas vias para comparações múltiplas seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak, consideradas estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Alterações Metabólicas Desencadeadas pela Dieta de Cafeteria

Apesar do semelhante consumo de ração entre os grupos controle e CAF (Figura 14A), a dieta de cafeteria aumentou significativamente o ganho de peso corporal (Figura 14B) e o índice de adiposidade dos animais, representado pelo aumento do peso dos tecidos adiposos mesentérico, epididimal e retroperitoneal (Figura 14C). A análise histológica do tecido adiposo epididimal mostrou ocorrer hipertrofia dos adipócitos no grupo CAF em comparação ao grupo controle (Figura 14D).

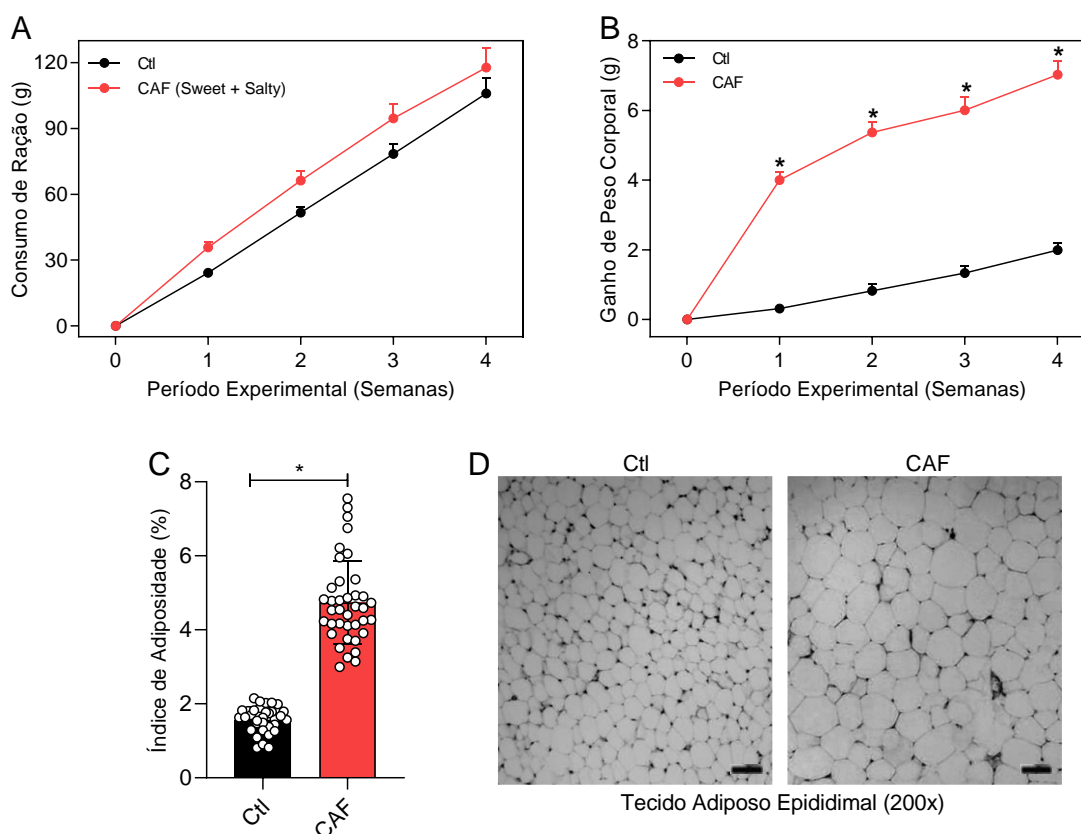


Figura 14 - Avaliação do (A) consumo de ração, (B) ganho de peso corporal, (C) índice de adiposidade e (D) histologia do tecido adiposo epididimal nos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 25-35 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

Além disso, o grupo CAF apresentou intolerância oral à glicose (Figura 15A) e resistência à insulina (Figura 15B), com aumento significativo nos níveis séricos de glicose (Figura 15C), triglicerídeos (Figura 15D) e colesterol total (Figura 15E).

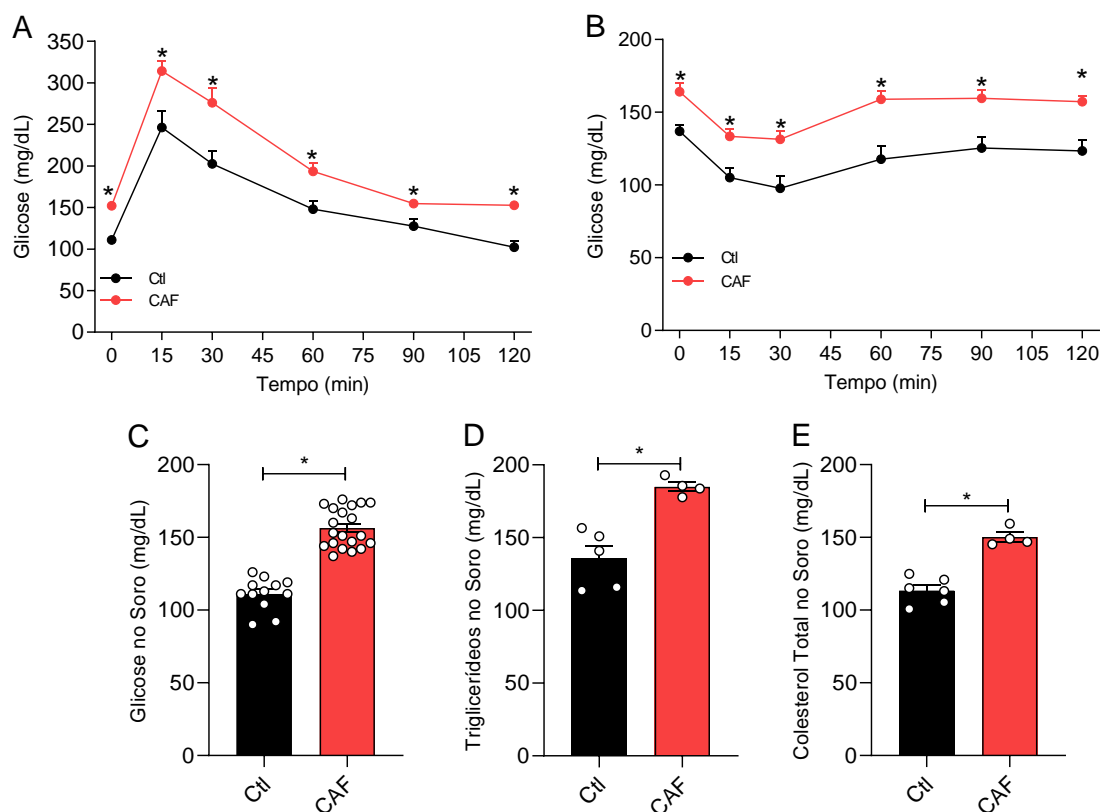


Figura 15 - Testes de (A) tolerância oral a glicose e (B) sensibilidade à insulina, (C) níveis séricos de glicose, (D) triglicerídeos e (E) colesterol total nos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 4-20 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

O aumento significativo nos níveis de triglicerídeos e colesterol total no soro poderiam contribuir para o acúmulo de gordura ectópica em órgãos como o fígado. Apesar da dieta de cafeteria não alterar o peso do fígado dos animais (Figura 16A), houve aumento significativo da gordura total hepática (Figura 16B), com alteração do conteúdo lipídico hepático relacionado ao aumento da concentração de triglicerídeos (Figura 16C), sem alterações na concentração de colesterol (Figura 16D). A análise histológica do fígado exibiu acúmulo de gotículas de lipídeos no grupo CAF em comparação ao grupo controle, indicando esteatose hepática (Figura 16E).

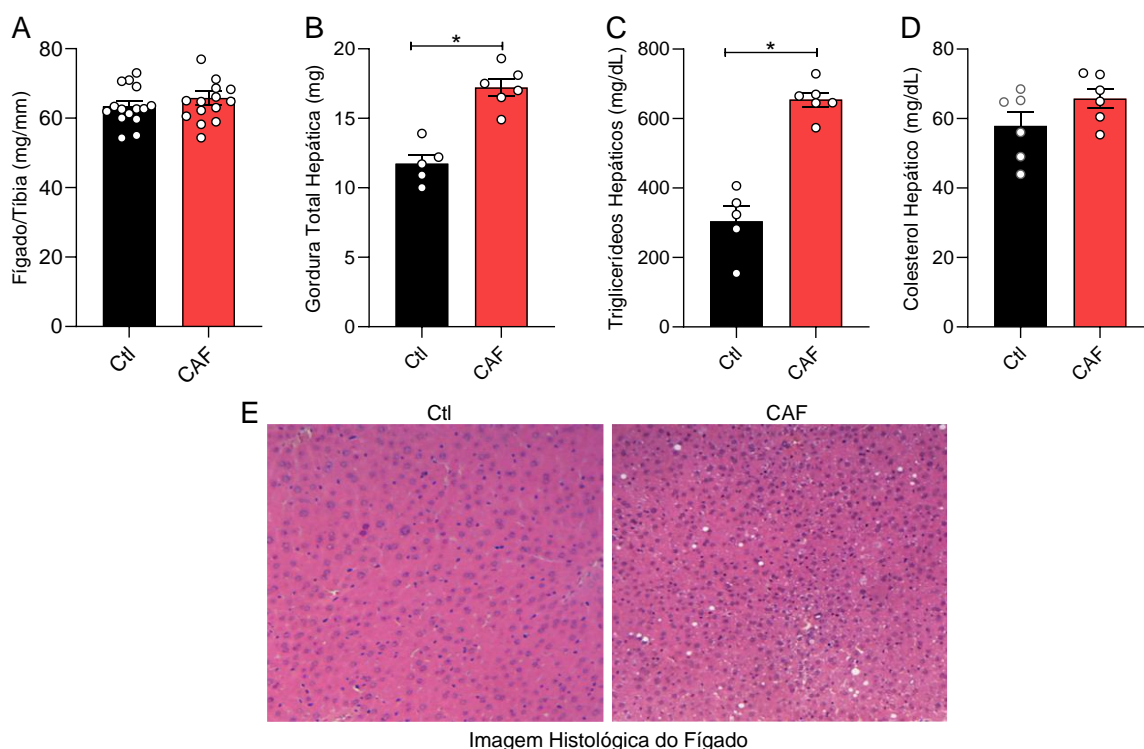


Figura 16 - (A) Peso do fígado, (B) gordura total hepática, concentrações de (C) triglicerídeos e (D) colesterol hepáticos, e (E) histologia do fígado nos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 5-15 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

Com relação aos níveis séricos de adipocinas, a dieta de cafeteria induziu aumento significativo de leptina em relação ao grupo controle, sem alterações nos níveis de adiponectina, quemerina e resistina (Tabela 2).

Tabela 2 – Níveis Séricos de Adipocinas nos Grupos Controle e CAF.

ADIPOCINA	CONTROLE	CAF	N
LEPTINA	0,894 \pm 0,215 (ng/mL)	2,165 \pm 0,518* (ng/mL)	7-8
ADIPONECTINA	1,46 \pm 0,047 (ng/mL)	1,57 \pm 0,061 (ng/mL)	7-8
QUEMERINA	46,611 \pm 32,44 (ng/mL)	50,950 \pm 22,38 (ng/mL)	3-6
RESISTINA	16,089 \pm 0,884 (ng/mL)	17,443 \pm 1,130 (ng/mL)	7-8

*Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

Em conjunto, esses resultados demonstraram que a dieta de cafeteria por 4 semanas induziu obesidade e síndrome metabólica, como evidenciado pelo aumento significativo do ganho de peso corporal e do índice de adiposidade, hiperlipidemia, hiperglicemia, intolerância oral à glicose e resistência à insulina.

4.2 Alterações Cardíacas Desencadeadas pela Dieta de Cafeteria

4.2.1 Pressão Arterial Sistólica

A dieta de cafeteria aumentou a pressão arterial sistólica dos animais a partir da segunda semana em estudo quando comparada ao grupo controle, mantendo-se elevada até o final da quarta semana (Figura 17).

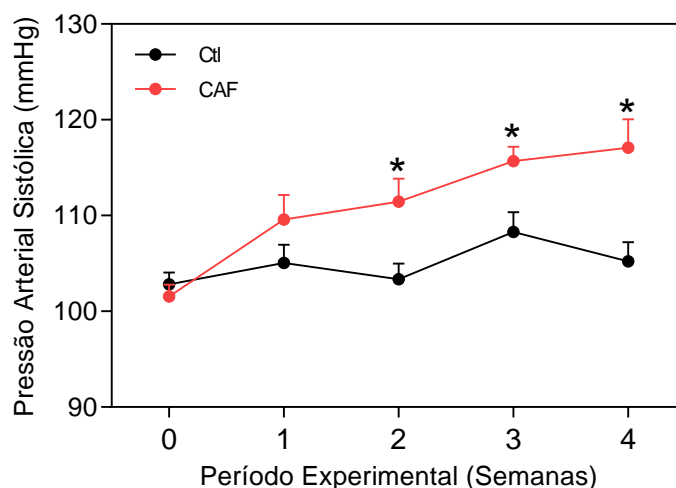


Figura 17 - (A) Pressão arterial sistólica nos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 7-11 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

4.2.2 Eletrocardiograma

A Figura 18A ilustra o eletrocardiograma (ECG) representativo dos grupos controle e CAF. Os animais do grupo CAF exibiram ritmo sinusal regular e eixo cardíaco normal ($0-90^\circ$) em comparação ao grupo controle. O intervalo da onda P (Figura 18B), assim como os intervalos QRS (Figura 18C) e QTc (Figura 18D), foram semelhantes entre os grupos. No entanto, o intervalo PR foi significativamente maior no grupo CAF em comparação ao grupo controle (Figura 18E), embora a frequência cardíaca tenha sido semelhante entre os grupos (Figura 18F). Além disso, a amplitude da onda P (Figura 18G) tende a aumentar no grupo CAF, embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos. As amplitudes das ondas R (Figura 18H) e T (Figura 18I) também foram semelhantes entre os grupos.

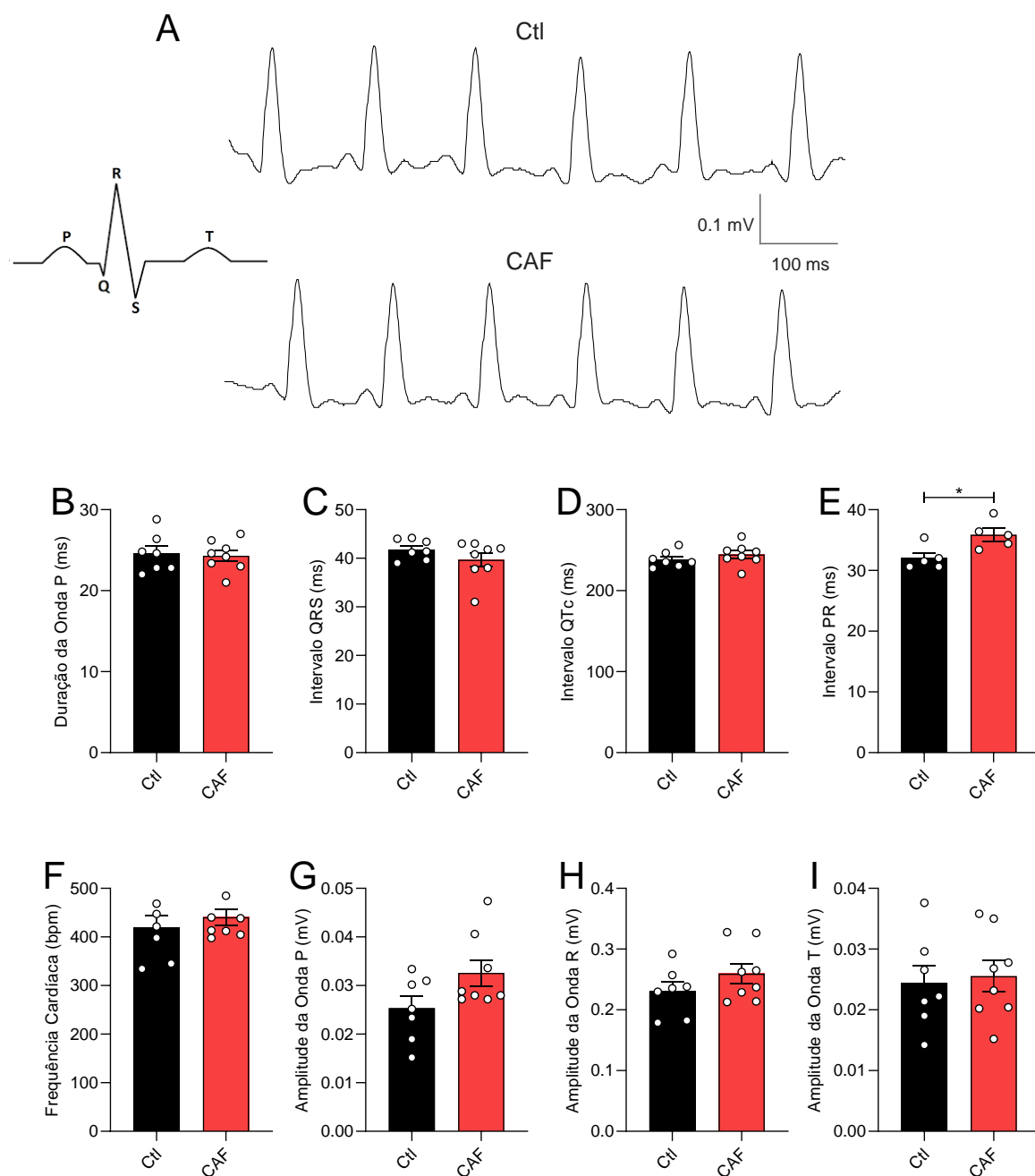


Figura 18 – Eletrocardiograma. (A) ECG representativo dos grupos controle e CAF; (B) Duração da onda P; (C) Intervalo QRS; (D) Intervalo QTc; (E) Intervalo PR; (F) Frequência cardíaca; (G) Amplitude da onda P; (H) Amplitude da onda R; (I) Amplitude da onda T dos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 5-8 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

4.2.3 Peso do Coração

O peso do coração dos animais do grupo CAF foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle (Figura 19).

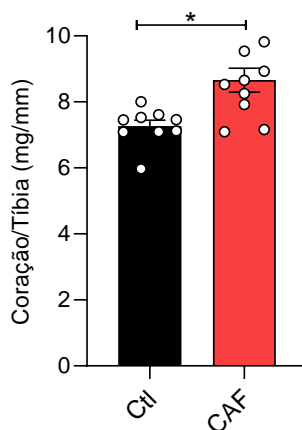


Figura 19 - (A) Peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia nos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 9 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0,05$) vs. grupo Ctl.

4.2.4 Função Cardíaca

A técnica de Langendorff utilizada para avaliar a função cardíaca em coração isolado demonstrou aumento significativo na pressão de perfusão do coração no grupo CAF, refletindo o aumento da resistência vascular oferecida pelas artérias coronárias (Figura 20A). A função contrátil basal do ventrículo esquerdo foi verificada por meio da pressão exercida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e por meio da razão da derivada da pressão pela derivada do tempo (dP/dt) máxima (dP/dt_{max}) e mínima (dP/dt_{min}), cálculo que envolve a variação de pressão em um determinado intervalo de tempo. Os resultados obtidos demonstraram aumento significativo da PDVE (Figura 20B) e das dP/dt_{max} (Figura 20C) e dP/dt_{min} (Figura 20D), representando maiores atividades inotrópica e lusitrópica basais exercida pelo ventrículo esquerdo no grupo CAF em comparação ao grupo controle.

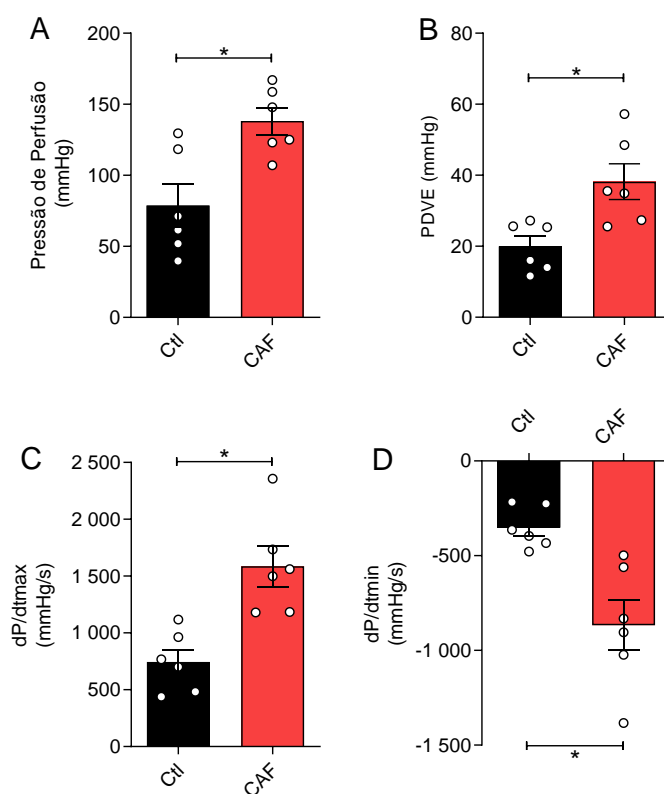


Figura 20 - (A) Pressão de perfusão do coração; (B) Pressão exercida pelo ventrículo esquerdo (PDVE); (C) dP/dt_{max} e (D) dP/dt_{min} . Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 6 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

Quando o coração foi desafiado por meio do estresse farmacológico com isoprenalina, agonista β não seletivo, a função contrátil do ventrículo esquerdo no grupo CAF demonstrou ser significativamente menos responsiva quando comparada ao grupo controle (Figura 21A,B). O mesmo resultado foi observado para as dP/dt_{max} (Figura 21C) e dP/dt_{min} (Figura 21D). Portanto, apesar do grupo CAF apresentar maiores valores basais de PDVE, dP/dt_{max} e dP/dt_{min} em relação ao grupo controle, frente ao estímulo farmacológico com isoprenalina, foram observadas atividades inotrópica e lusitrópica menores no grupo CAF em relação ao grupo controle.

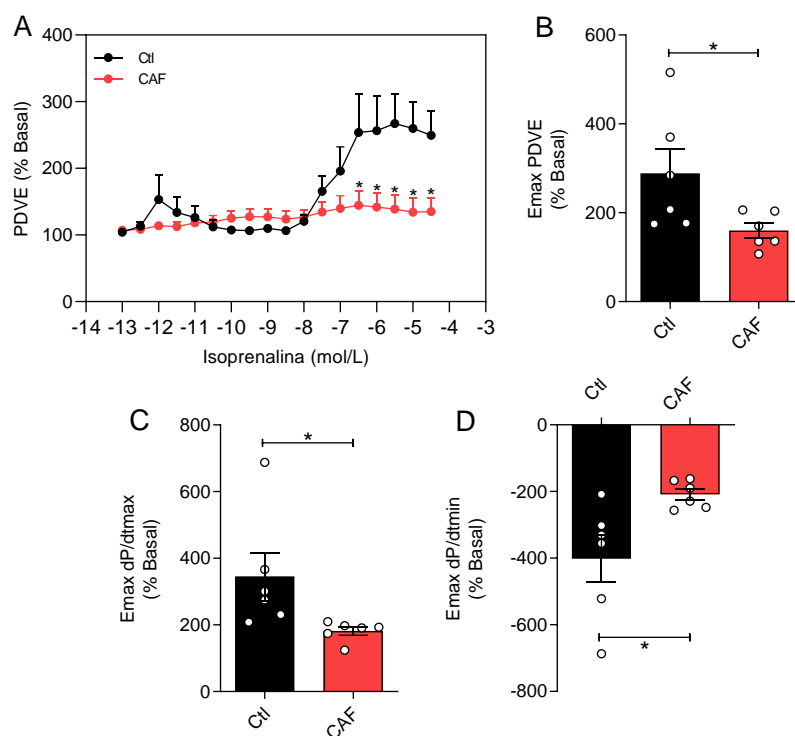


Figura 21 - (A) % de mudança da PDVE frente à curva concentração-resposta à isoprenalina; (B) Emax % de mudança frente ao estímulo com isoprenalina; (C) dP/dt_{max} e (D) dP/dt_{min} frente ao estímulo com isoprenalina. Os valores representam a média ±EPM obtida em um n de 6 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl.

4.2.5 Contratilidade dos Cardiomiócitos

Uma vez que a dieta de cafeteria desencadeou alterações na função cardíaca, para verificar como estaria a funcionalidade celular, os cardiomiócitos foram isolados e a contratilidade celular foi avaliada. Os resultados mostraram que a dieta de cafeteria não alterou a área (Figura 22A), o comprimento (Figura 22B) e a largura dos cardiomiócitos (Figura 22C).

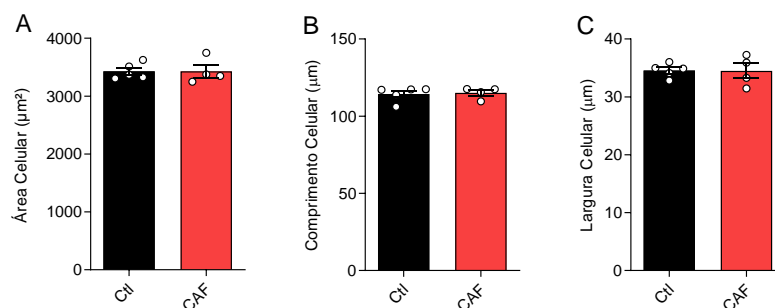


Figura 22 - Medida da (A) área, (B) comprimento e (C) largura dos cardiomiócitos isolados dos grupos controle e CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em um n de 4-5 animais para cada grupo estudado.

Quando avaliados os parâmetros de tempo e velocidade de contratilidade celular, o grupo CAF apresentou aumento significativo do tempo de contração (Figura 23A) e do tempo de relaxamento (Figura 23B) do cardiomiócito, refletindo no aumento do tempo total de contração-relaxamento celular (Figura 23C) em relação ao grupo controle.

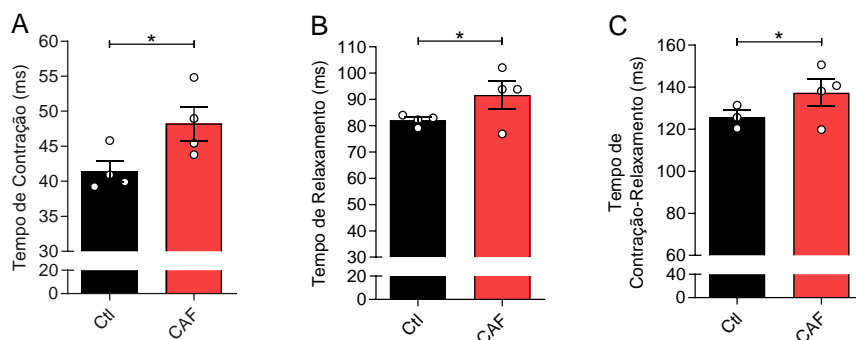


Figura 23 - Tempo de (A) contração, (B) relaxamento e (C) contração-relaxamento dos cardiomiócitos isolados nos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 4 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0,05$) vs. grupo Ctl.

Contudo, a velocidade de contração (Figura 24A) e relaxamento (Figura 24B) celular foi significativamente maior no grupo CAF quando comparado ao grupo controle. Por conseguinte, visto que os cardiomiócitos do grupo CAF levam mais tempo para contrair e relaxar, porém, em uma velocidade mais alta, isso resulta em uma maior área de encurtamento das células cardíacas no grupo CAF em relação ao grupo controle (Figura 24C).

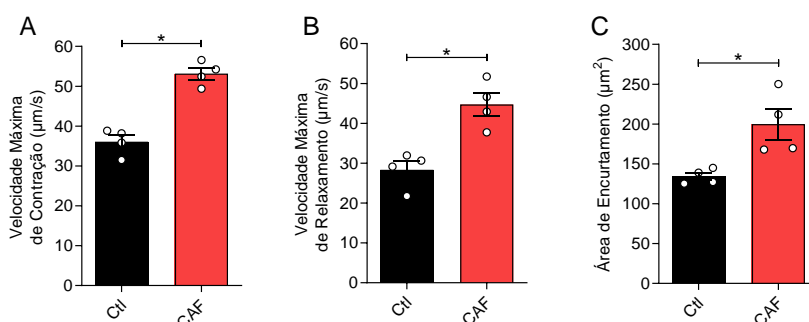


Figura 24 - Velocidade máxima de (A) contração e (B) relaxamento celular; e (C) área de encurtamento dos cardiomiócitos nos grupos controle e CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 4 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0,05$) vs. grupo Ctl.

Em conjunto, os resultados encontrados demonstram que a dieta de cafeteria alterou o perfil da contratilidade dos cardiomiócitos, exacerbando a resposta de contração e relaxamento celular (Figura 25).

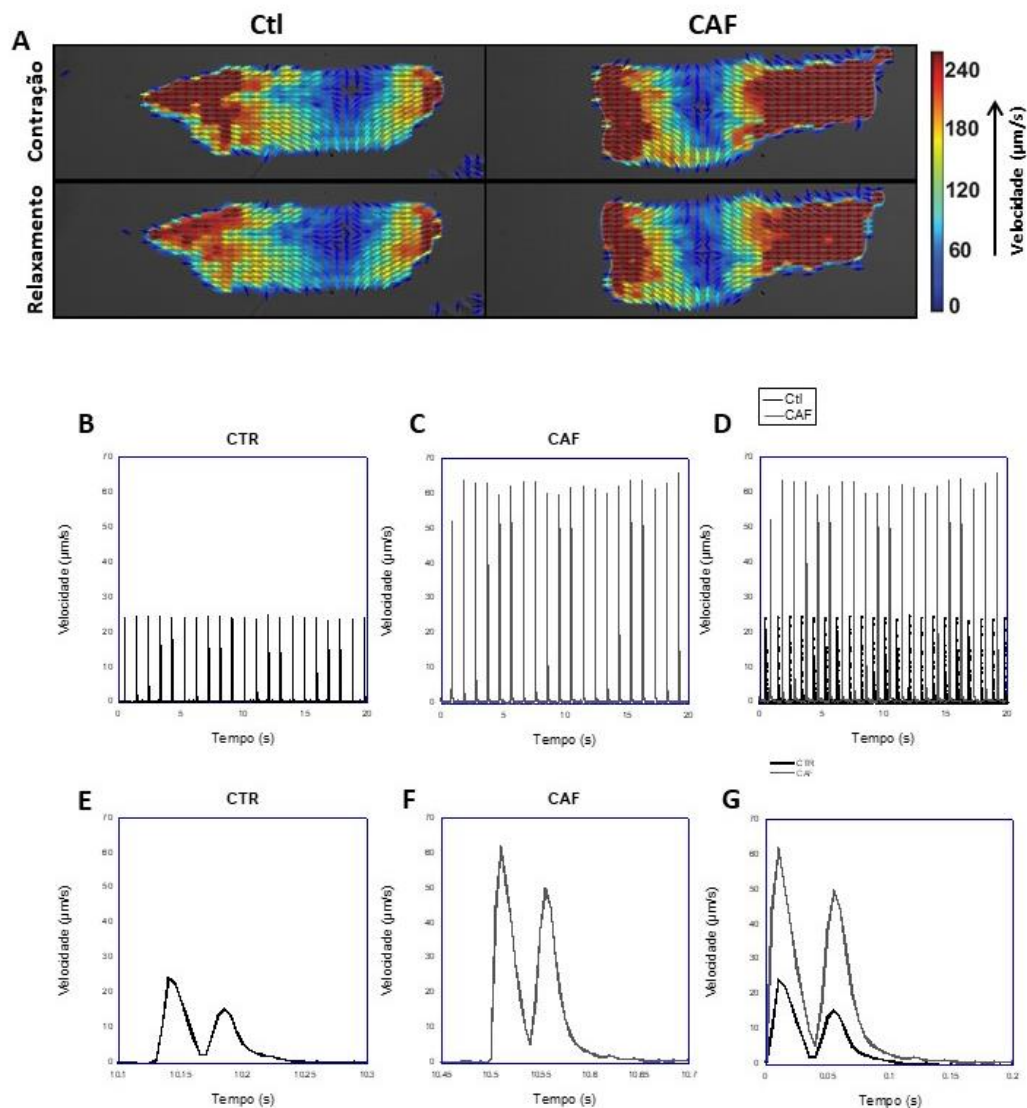


Figura 25 - Representação vetorial e gráfica do perfil de contratilidade de cardiomiócitos nos grupos controle e CAF. (A) Representação vetorial da velocidade espacial celular durante a velocidade de contração e velocidade de relaxamento; **(B-C)** Perfil de vinte ciclos de contratilidade celular registradas durante 20s em cada grupo e **(E-F)** durante um ciclo de contração-relaxamento; **(D)** Gráfico comparativo dos grupos controle e CAF durante vinte ciclos e **(G)** durante um ciclo de contração-relaxamento.

4.3 Alterações Vasculares Desencadeadas pela Dieta de Cafeteria

4.3.1 Caracterização da Contração Vascular Induzida por PE

Experimentos de reatividade vascular realizados em aortas torácicas com o endotélio íntegro demonstraram que, no grupo controle, a presença do PVAT não alterou o efeito máximo de contração vascular induzido por PE (Figura 26A,D). Entretanto, a potência de contração foi significativamente reduzida na presença do PVAT, representado pelo deslocamento à direita da curva concentração-resposta induzida por PE (Figura 26A,E). Por outro lado, no grupo CAF, a presença do PVAT aumentou significativamente o efeito máximo da contração vascular induzida por PE (Figura 26B,D). A redução significativa da potência da contração vascular observada na presença do PVAT no grupo CAF poderia ser justificada pela variação no “*slope*” das curvas na presença e ausência do PVAT (Figura 26B,E).

Quando sobreposamos as curvas concentração-resposta da vasoconstrição induzida por PE nos grupos controle e CAF (Figura 26C,D), é possível visualizar um efeito paradoxo da obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria, em que ao mesmo tempo em que ela leva a significativa diminuição da contratilidade vascular tanto na ausência quanto na presença do PVAT, essa diminuição foi parcialmente compensada na presença do tecido adiposo circundante, sugerindo um perfil vasoconstritor do PVAT na tentativa de restabelecer a contração vascular induzida por PE no grupo CAF.

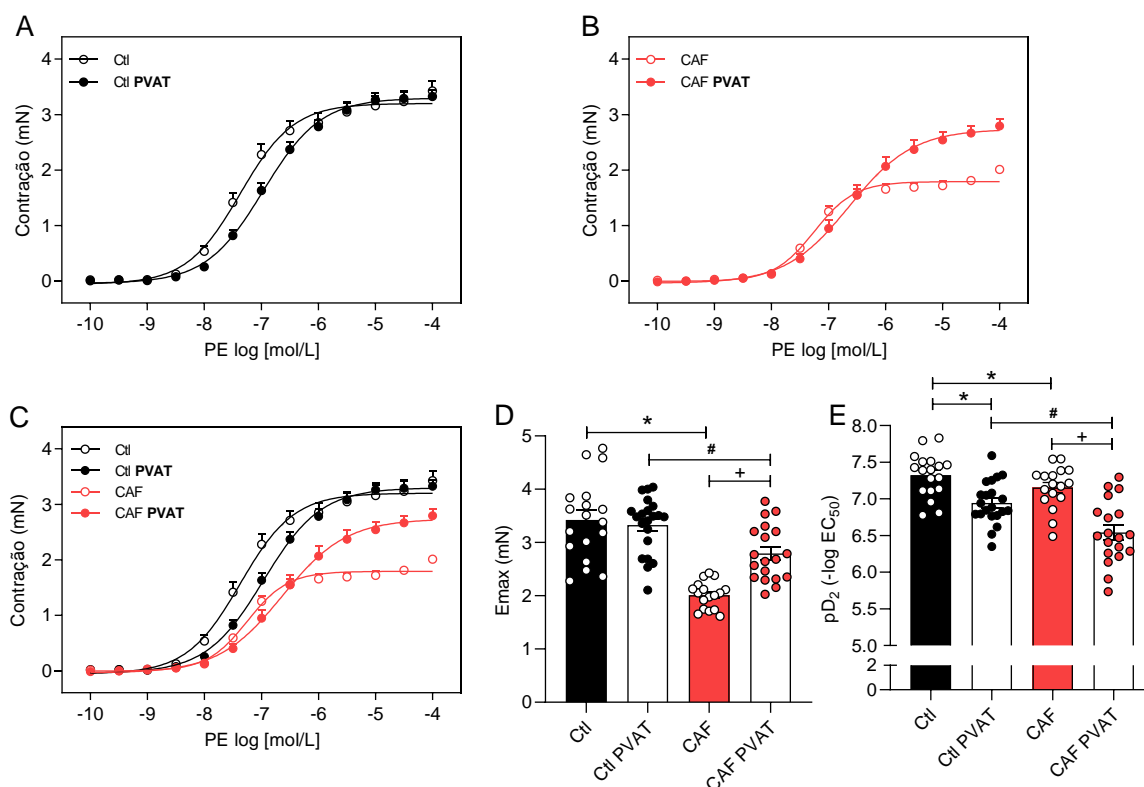


Figura 26 - Contração vascular induzida por PE em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE nos grupos (A) controle e (B) CAF; (C) sobreposição dos resultados encontrados nos grupos controle e CAF; valores de (D) Emax e (E) pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=17-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. #Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl PVAT. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF.

4.3.2 Caracterização do Relaxamento Vascular Induzido por ACh

Visto que a dieta de cafeteria reduziu significativamente a contração vascular induzida por PE, foi verificado como estaria o relaxamento vascular induzido por ACh. No grupo controle, a presença do PVAT não alterou o efeito máximo (Figura 27A,D) e a potência (Figura 27A,E) da vasodilatação induzida por ACh. O mesmo resultado foi observado no grupo CAF (Figura 27B,D,E). A sobreposição das curvas (Figura 27C) mostrou que a dieta de cafeteria não alterou o relaxamento vascular endotélio dependente induzido por ACh.

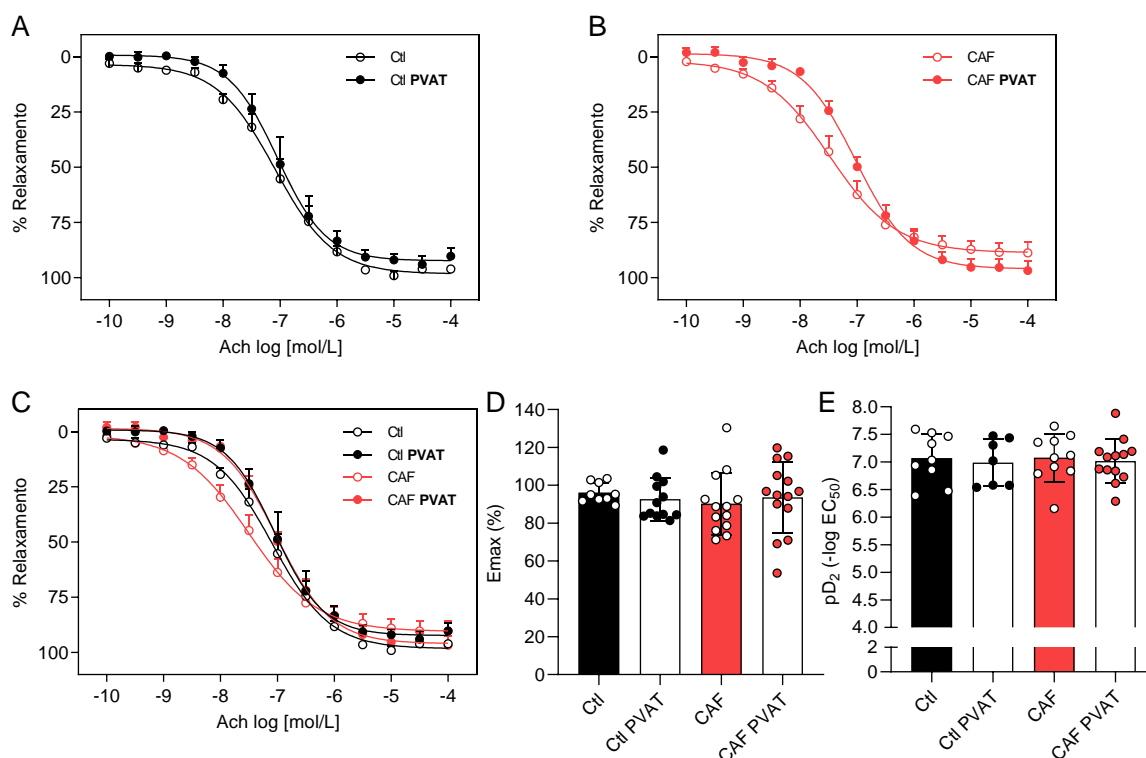


Figura 27 - Relaxamento vascular induzido por ACh em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta vasodilatadora induzida por ACh nos grupos (A) controle e (B) CAF; (C) sobreposição dos resultados encontrados nos grupos controle e CAF; valores de (D) Emax e (E) pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=7-13).

Em conjunto, esses resultados demonstram que a dieta de cafeteria desencadeia um perfil hiporresponsivo da aorta torácica na ausência do tecido adiposo circundante frente ao estímulo vasoconstritor induzido por PE, sem alterações na função endotelial frente ao estímulo vasodilatador induzido por ACh. O perfil vasoconstritor do PVAT observado no grupo CAF sugere a tentativa de compensar e restabelecer a contratilidade vascular induzida por PE.

Tendo isso em vista, os resultados a seguir foram delineados em duas etapas. A primeira etapa objetivou identificar os mecanismos de ação responsáveis pela diminuição da resposta contrátil em aortas sem PVAT do grupo CAF. Já a segunda etapa objetivou investigar os possíveis fatores vasoconstritores liberados pelo PVAT na tentativa de restabelecer a contratilidade vascular em aortas dos animais que receberam dieta de cafeteria.

ETAPA I

4.3.3 Mecanismos de Ação Envolvidos na Hiporresponsividade Aórtica Desencadeada pela Dieta de cafeteria

Como abordado anteriormente, a dieta de cafeteria aumentou significativamente os níveis séricos de leptina. Sabe-se que a leptina é capaz de ativar a via de sinalização PI3K-Akt que leva à fosforilação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) responsável pela síntese do óxido nítrico, potente vasodilatador que nos vasos sanguíneos exerce importante função no controle do tônus vascular. Assim, a exacerbação dessa cascata de ativação desencadeada pelo aumento nos níveis séricos de leptina poderia levar a uma menor contratilidade vascular no grupo CAF. Os experimentos demonstrados a seguir visaram ratificar essa hipótese levantada.

4.3.3.1 Ativação do Receptor da Leptina

Para verificar a participação da ativação do receptor da leptina na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, a técnica de antisense oligodesoxinucleotídeos (AS-ODN) *in vivo* foi utilizada para a redução da expressão proteica do receptor da leptina (ObR *knockdown*). No grupo controle, o silenciamento do receptor da leptina não alterou a contração vascular induzida por PE (Figura 28A,D,E). Entretanto, no grupo CAF, o silenciamento do receptor da leptina aumentou significativamente o efeito máximo da vasoconstrição induzida por PE (Figura 28B,D), resultando no restabelecimento da contração vascular no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 28C,D,E), sugerindo o seu envolvimento na hiporresponsividade aórtica induzida pela dieta de cafeteria.

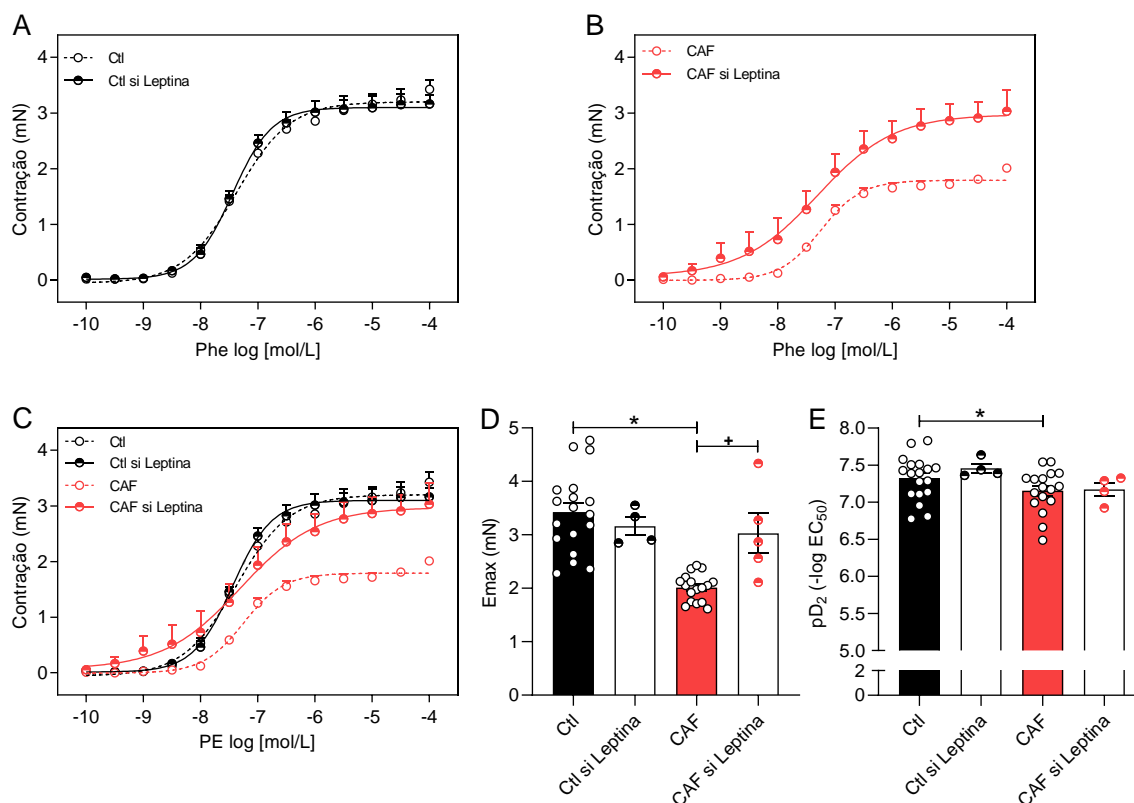


Figura 28 – Silenciamento do receptor da leptina. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE 24 h após o silenciamento do receptor da leptina: (A) grupo controle; (B) grupos CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de Emax e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF.

4.3.3.2 Ativação da PI3K

Visando confirmar a participação da ativação da PI3K na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, as aortas dos grupos controle e CAF foram pré-incubadas com o inibidor da PI3K, LY294,002. No grupo controle, a inibição da PI3K não alterou a contração vascular induzida por PE (Figura 29A,D,E). Por outro lado, no grupo CAF, a incubação prévia com LY294,002 restabeleceu o efeito máximo da contração vascular induzida por PE ao nível obtido no grupo controle (Figura 29B,C,D). Entretanto, a potência de contração permaneceu significativamente reduzida no grupo CAF em relação ao grupo controle, representado pelo deslocamento à direita da curva concentração-resposta induzida por PE no grupo CAF (Figura 29C,E), sugerindo a participação parcial da PI3K na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF.

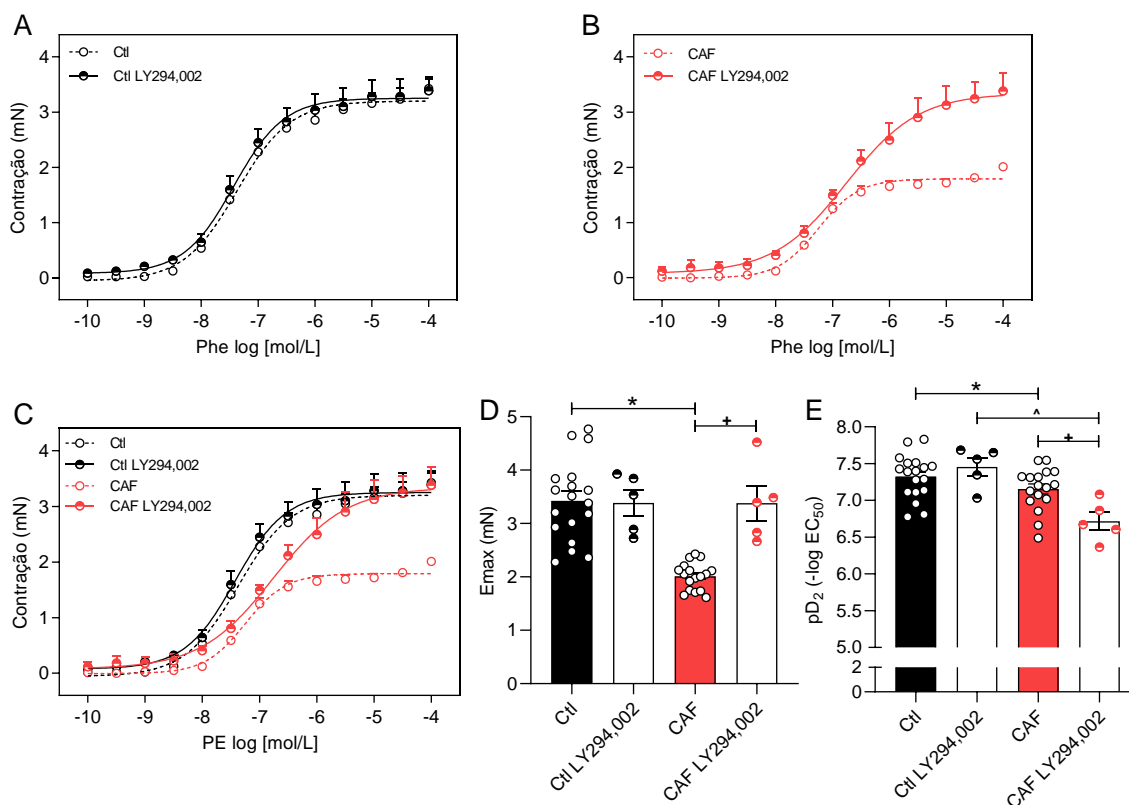


Figura 29 – Inibição da PI3K com LY294,002 em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em aortas previamente incubadas ou não com LY294,002: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de Emax e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=5-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. ^Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl LY294,002.

4.3.3.3 Ativação da NOS

Sabendo-se que a ativação da via PI3K-Akt leva a fosforilação da NOS, verificamos o seu envolvimento na diminuição da contração vascular induzida por PE em aortas sem PVAT do grupo CAF. Para isso, as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com L-NAME, inibidor não seletivo da NOS. No grupo controle, a inibição da NOS aumentou significativamente o efeito máximo (Figura 30A,D) e a potência (Figura 30A,E) da contração vascular induzida por PE. O mesmo resultado foi observado no grupo CAF (Figura 30B,D,E), resultando no restabelecimento do efeito máximo da contração vascular induzido por PE no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 30C,D). Entretanto, a potência de contração permaneceu significativamente reduzida no grupo CAF em relação ao grupo controle, representado pelo deslocamento à direita da curva concentra-

resposta induzida por PE no grupo CAF (Figura 30C,E), sugerindo a participação parcial da NOS na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF.

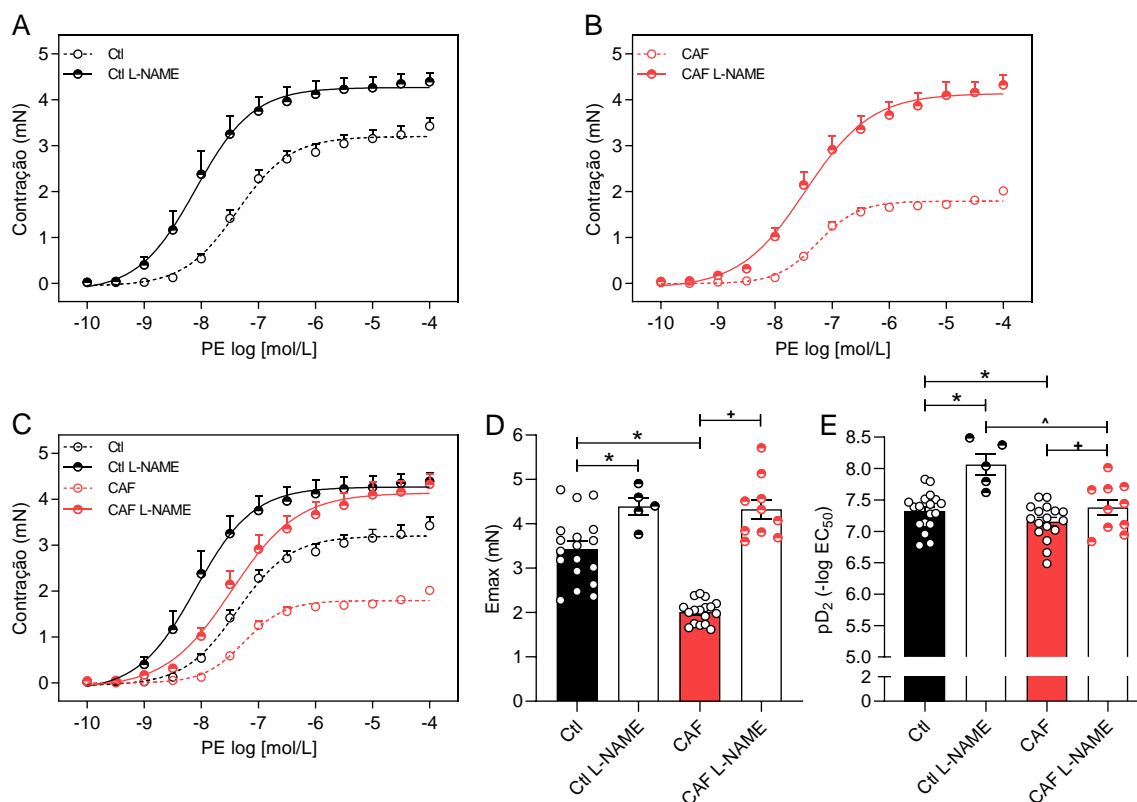


Figura 30 – Inibição não seletiva da NOS com L-NAME em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE encontrados nas aortas dos grupos controle e CAF incubadas com L-NAME: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de Emax e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=5-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. no grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. ^Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl L-NAME.

4.3.3.4 Determinação dos Níveis de NO

Visto que a NOS participa, ao menos em parte, da diminuição da contração vascular induzida por PE em aortas sem PVAT do grupo CAF, os resultados a seguir tiveram como objetivo quantificar os níveis de NO em aortas dos grupos controle e CAF. Nas imagens da Figura 31 é possível visualizar o aumento na intensidade de fluorescência entre as fibras de elastina no grupo CAF (Figura 31B) quando comparado ao grupo controle (Figura 31A). Esse resultado foi confirmado pela análise quantitativa da intensidade de fluorescência emitida corrigida pela área (Figura 31C), no qual é possível verificar o aumento significativo nos níveis de NO

na aorta do grupo CAF em relação ao grupo controle. A intensidade de fluorescência foi cuidadosamente analisada entre as fibras de elastina no intuito de evitar a autofluorescência.

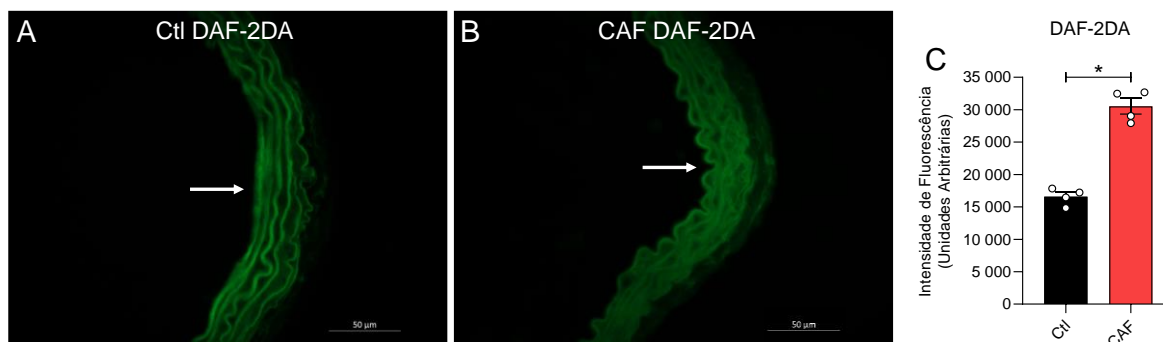


Figura 31 – Biodisponibilidade de NO em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. A quantificação da produção de NO foi realizada *in situ*, mediante exposição das aortas à sonda DAF-2DA. (A) Grupo controle; (B) Grupo CAF. As setas indicam a localização da camada endotelial dos vasos sanguíneos. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência. Os valores representam a média \pm EPM obtida a partir de diferentes preparações (n=4). *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl.

4.3.3.5 Participação das Isoformas das NOS

Confirmado o envolvimento parcial da NOS, bem como o aumento nos níveis de NO na aorta do grupo CAF, o próximo passo foi investigar quais isoformas da NOS estariam relacionadas à diminuição da contração vascular induzida por PE em aortas sem PVAT do grupo CAF. Primeiramente, para verificar a participação da isoforma endotelial da NOS (eNOS), a técnica de antisense oligodesoxinucleotídeos (AS-ODN) *in vivo* foi utilizada para a redução da expressão proteica da eNOS (eNOS *knockdown*). No grupo controle, o silenciamento da eNOS não alterou a contração vascular induzida por PE (Figura 32A,D,E). Entretanto, no grupo CAF o silenciamento da eNOS aumentou significativamente o efeito máximo da vasoconstrição induzida por PE (Figura 32B,D), resultando no restabelecimento da contração vascular no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 32C,D,E), sugerindo o seu envolvimento na hiporresponsividade aórtica induzida pela dieta de cafeteria.

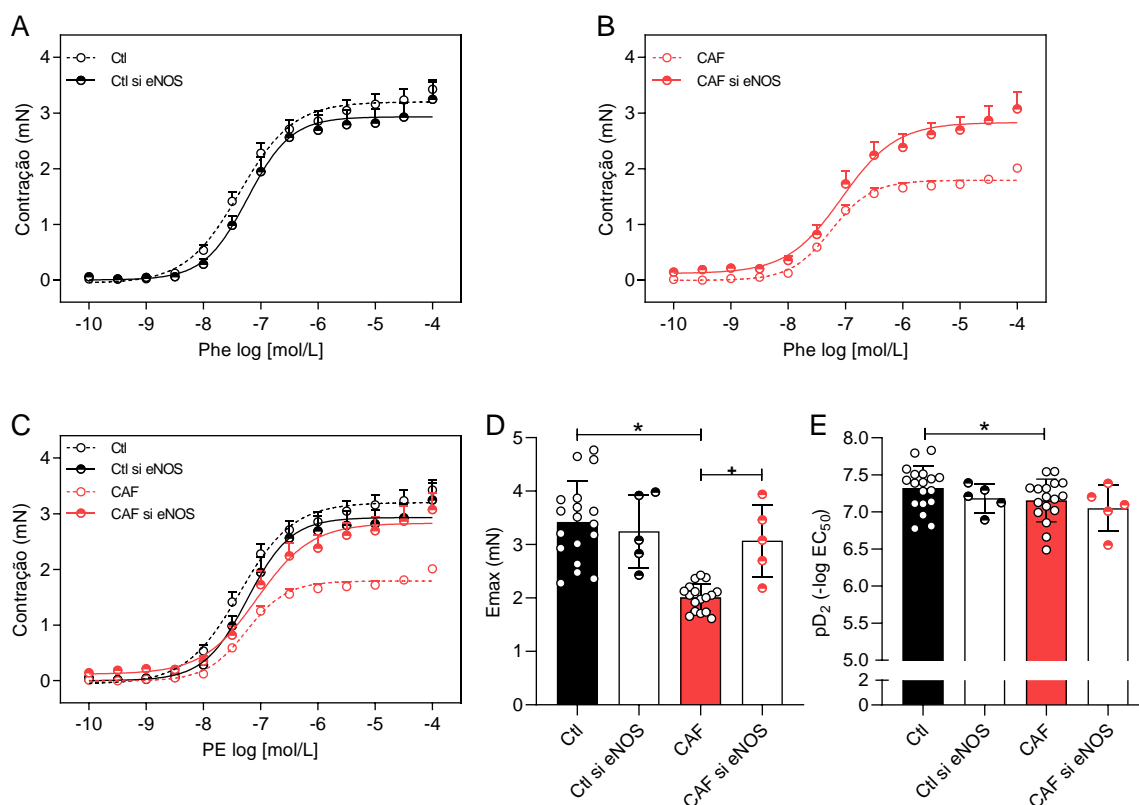


Figura 32 - Silenciamento da isoforma endotelial da NOS. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE 24 h após o silenciamento da eNOS: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de E_{max} e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=5-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF.

Posteriormente, verificamos a participação da isoforma neuronal da NOS (nNOS) na diminuição da contração vascular induzida por PE em aortas sem PVAT do grupo CAF. A inibição seletiva da nNOS com 7Ni não alterou a vasoconstrição induzida por PE nos grupos controle (Figura 33A,D,E) e CAF (Figura 33B,D,E), resultando no não reestabelecimento da contração vascular induzida por PE no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 33C,D,E).

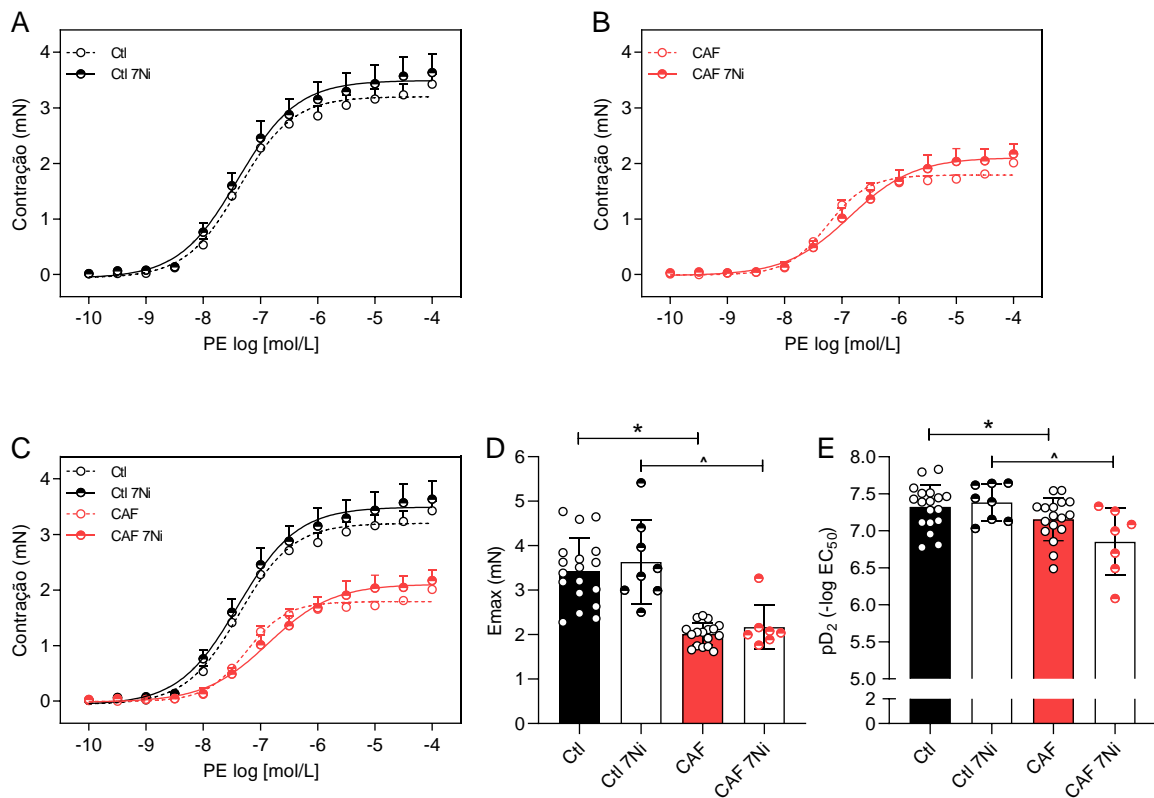


Figura 33 - Inibição seletiva da isoforma neuronal da NOS em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE encontrados nas aortas dos grupos controle e CAF incubadas com 7Ni: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de Emax e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=7-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. ^Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl 7Ni.

Por fim, avaliamos o envolvimento da isoforma induzida da NOS (iNOS) na diminuição da contração vascular induzida por PE em aortas sem PVAT do grupo CAF. Semelhante ao resultado encontrado após a inibição da nNOS, a inibição seletiva da iNOS com 1400W não alterou a vasoconstrição induzida por PE nos grupos controle (Figura 34A,D,E) e CAF (Figura 34B,D,E), resultando no não reestabelecimento da contração vascular induzida por PE no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 34C,D,E).

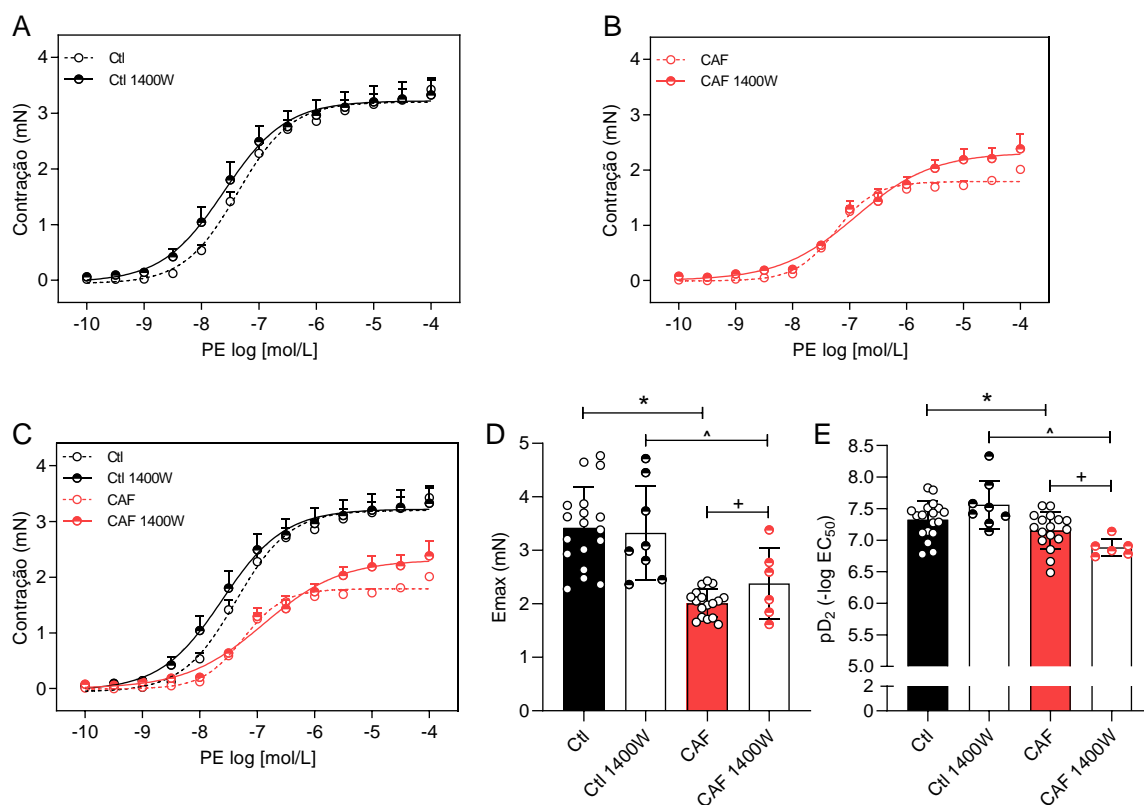


Figura 34 - Inibição seletiva da isoforma induzida da NOS em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE encontrados nas aortas dos grupos controle e CAF incubadas com 1400W: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de Emax e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=6-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. ^Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl 1400W.

4.3.3.6 Imunofluorescência das Isoformas da NOS

A técnica de imunofluorescência foi realizada no intuito de identificar a localização das isoformas da NOS em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF, e verificar se a dieta de cafeteria poderia alterar a intensidade de fluorescência emitida entre os grupos dependendo da isoforma analisada. A imunomarcagem revelou a presença das isoformas endotelial, neuronal e induzida da NOS em aortas sem PVAT dos grupos controle (Figura 35A,D,G) e CAF (Figura 35B,E,H). No entanto, é possível visualizar o aumento na intensidade de fluorescência emitida no grupo CAF apenas da eNOS quando comparado ao grupo controle (Figura 35A,B), resultado confirmado pela análise quantitativa da intensidade de fluorescência (Figura 35C).

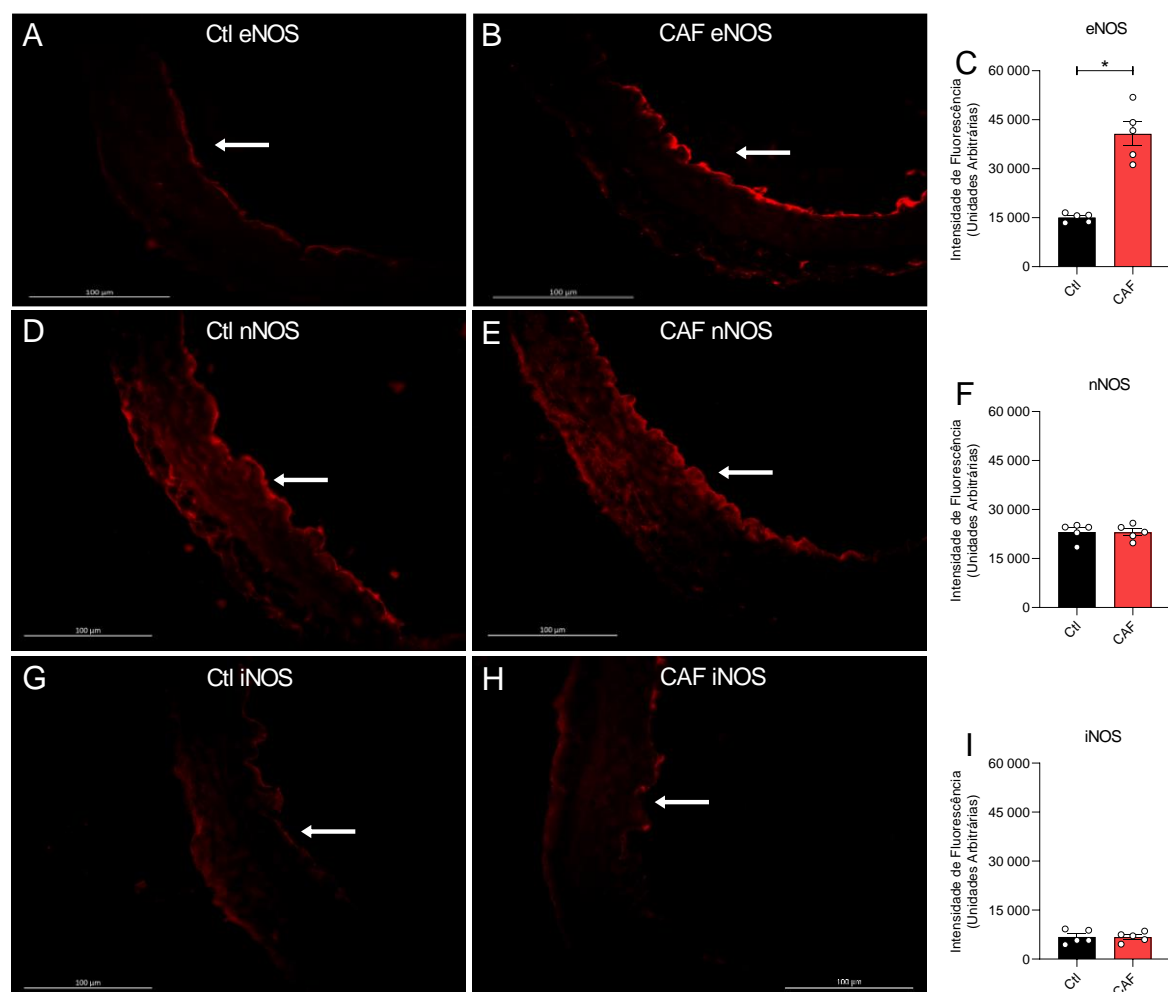


Figura 35 – Imunofluorescência das isoformas endotelial, neuronal e induzida na NOS em aortas dos grupos controle e CAF. Imunomarcagem das isoformas (A e B) eNOS, (D e E) nNOS e (G e H) iNOS. A intensidade de fluorescência emitida pela ligação do anticorpo secundário seletivo às isoformas (C) eNOS, (F) nNOS e (I) iNOS foi representada no gráfico de barras. Os valores representam a média \pm EPM obtida a partir de diferentes preparações (n=5). *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência. As setas indicam a localização da camada endotelial dos vasos sanguíneos.

4.3.3.7 Participação do Endotélio Vascular

Visto que apenas a isoforma endotelial da NOS participa da diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, verificamos qual seria o papel do endotélio nesse efeito. No grupo controle, a retirada do endotélio resultou no aumento significativo do efeito máximo (Figura 36A,D) e da potência (Figura 36A,E) da contração vascular induzida por PE. O mesmo resultado foi observado no grupo CAF (Figura 36B,D,E), resultando no restabelecimento do efeito máximo da contração vascular induzido por PE no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 36C,D). Entretanto, a potência de contração permaneceu significativamente

reduzida no grupo CAF em relação ao grupo controle, representado pelo deslocamento à direita da curva concentração-resposta induzida por PE no grupo CAF (Figura 36C,E) semelhante ao resultado encontrado em aortas pré-incubadas com L-NAME, sugerindo a participação parcial do endotélio na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF.

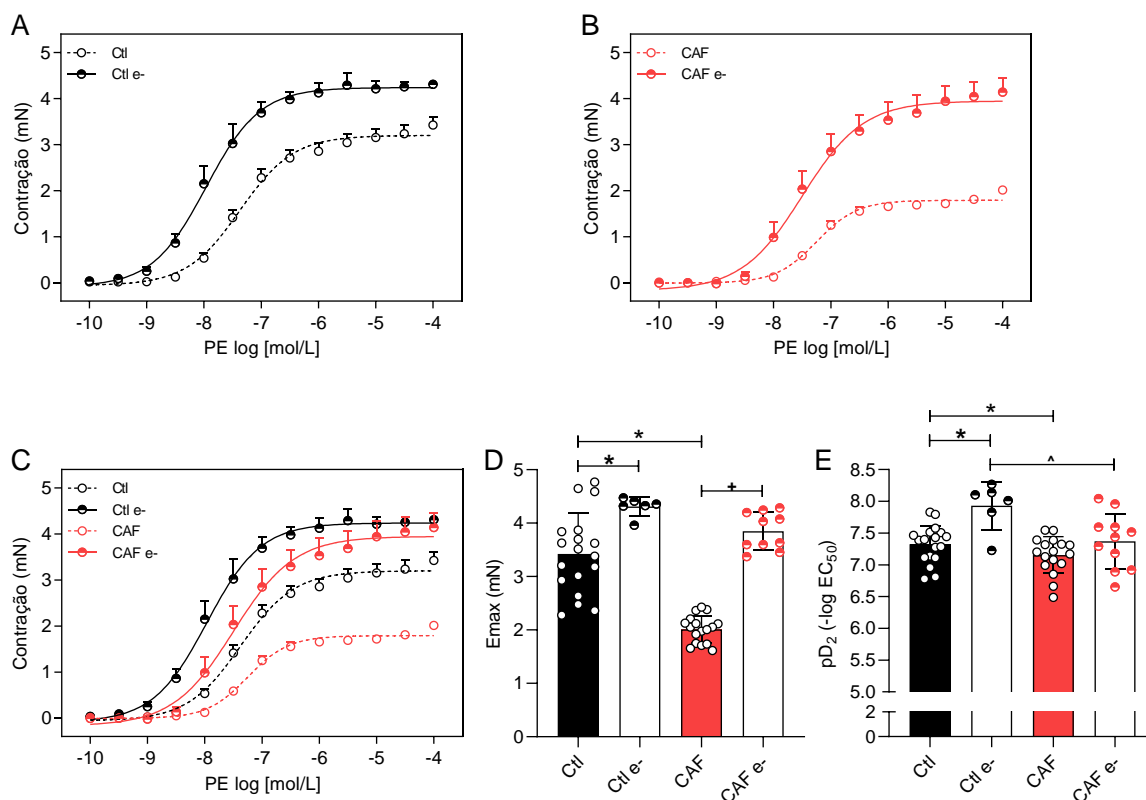


Figura 36 – Retirada do endotélio vascular em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE encontrados nas aortas dos grupos controle e CAF com ou sem endotélio: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de Emax e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=6-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. ^Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl e.

4.3.3.8 Participação do Peróxido de Hidrogênio

Outro vasodilatador investigado foi o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que atua como uma importante molécula de sinalização na regulação do tônus vascular. Para isso, as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com catalase, responsável pela decomposição do H₂O₂. No grupo controle, a incubação prévia com catalase não alterou a vasoconstrição induzida por PE (Figura 37A,D,E). Já no grupo CAF, a decomposição do H₂O₂ aumentou significativamente o efeito máximo

da contração vascular induzida por PE (Figura 37B,D). Entretanto, a resposta contrátil e a potência de contração permaneceram reduzidas no grupo CAF em comparação ao grupo controle (Figura 37C,D,E), sugerindo que o H_2O_2 estaria parcialmente envolvido na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF.

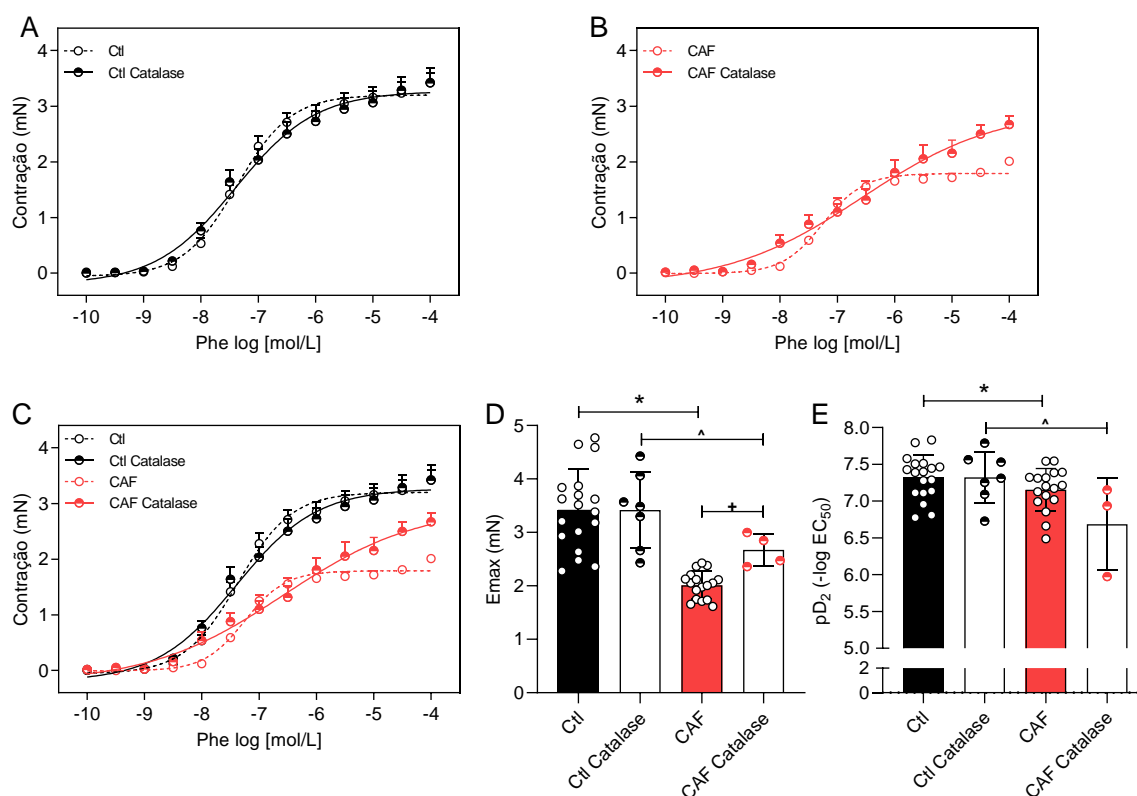


Figura 37 - Participação do H_2O_2 em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com catalase: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de E_{max} e (E) valores de pD_2 . Os valores representam a média \pm EPM obtida em diferentes preparações ($n=4-18$). *Representa diferença significativa ($P<0.05$) vs. grupo Ctl. ^Representa diferença significativa ($P<0.05$ vs. grupo CAF. ^Representa diferença significativa ($P<0.05$) vs. grupo Ctl Catalase.

4.3.3.9 Determinação dos Níveis de H_2O_2

Visto que a produção de H_2O_2 participa parcialmente da diminuição da contração vascular induzida por PE em aortas sem PVAT do grupo CAF, os resultados a seguir tiveram como objetivo quantificar os níveis de H_2O_2 em aortas dos grupos controle e CAF. Nas imagens da Figura 38 é possível visualizar o aumento na intensidade de fluorescência entre as fibras de elastina no grupo CAF (Figura 38B) quando comparado ao grupo controle (Figura 38A), resultado

confirmado pela análise quantitativa da intensidade de fluorescência emitida e corrigida pela área (Figura 38C), no qual é possível verificar o aumento significativo nos níveis de H_2O_2 na aorta do grupo CAF em relação ao grupo controle. A intensidade de fluorescência foi cuidadosamente analisada entre as fibras de elastina no intuito de evitar a autofluorescência.

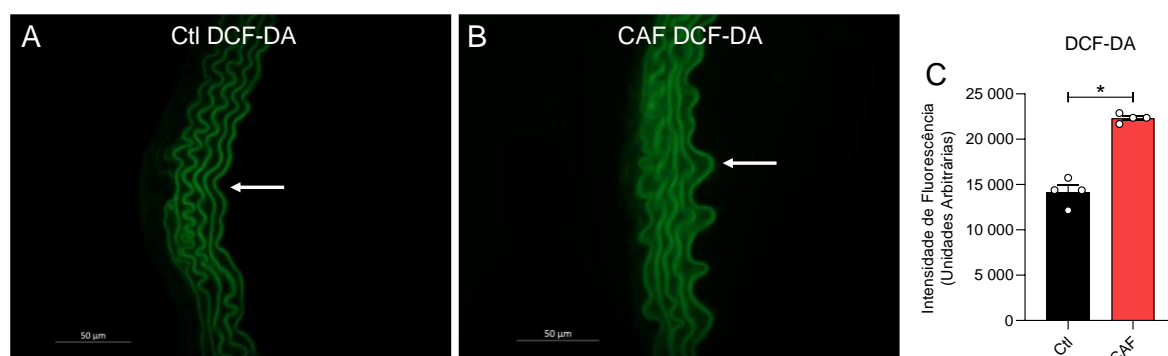


Figura 38 – Biodisponibilidade de H_2O_2 em aortas sem PVAT dos grupos controle e CAF. A quantificação da produção de H_2O_2 foi realizada *in situ*, mediante exposição das aortas à sonda DCF-DA. (A) Grupo controle; (B) Grupo CAF. As setas indicam a localização da camada endotelial dos vasos sanguíneos. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência. Os valores representam a média \pm EPM obtida em diferentes preparações (n=4). *Representa diferença significativa ($P<0.05$) vs. grupo Ctl.

4.3.3.10 Coparticipação da NOS e do H_2O_2

Visto que a ativação da NOS e a produção de H_2O_2 estariam parcialmente envolvidas na diminuição da contração vascular em aortas sem PVAT do grupo CAF, verificamos se a inibição simultânea da NOS e a decomposição de H_2O_2 seriam capazes de restabelecer a contratilidade vascular no grupo CAF. A incubação concomitante das aortas dos grupos controle e CAF com L-NAME e catalase aumentou significativamente o efeito máximo (Figura 39A,B,D) e a potência (Figura 39A,B,E) da contração vascular induzida por PE, restabelecendo por completo a resposta contrátil no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 39C,D,E).

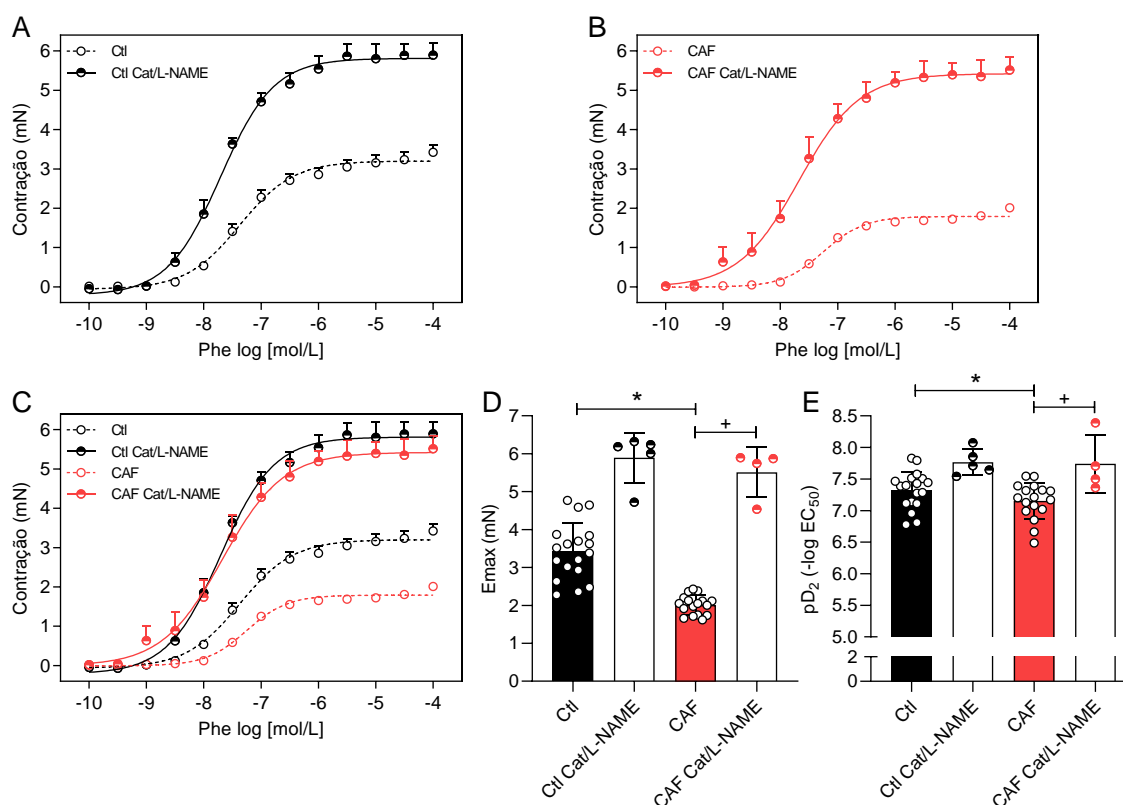


Figura 39 – Inibição simultânea da NOS e H₂O₂. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com L-NAME e catalase: (A) grupo controle; (B) grupo CAF; (C) sobreposição dos grupos controle e CAF; (D) valores de E_{max} e (E) valores de pD₂. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-18). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. ^Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl Cat/L-NAME.

ETAPA II

4.3.4 Mecanismos de Ação Envolvidos no Perfil Vasoconstritor do PVAT

Visto que a presença do PVAT aumentou a contração vascular induzida por PE no grupo CAF, os mecanismos de ação pelos quais o PVAT estaria tentando restabelecer a contratilidade vascular foram investigados.

4.3.4.1 Ativação do Sistema Renina-Angiotensina

Ao investigarmos a participação do sistema renina-angiotensina nos mecanismos de ação pelos quais o PVAT estaria tentando restabelecer a contratilidade vascular induzida por PE no grupo CAF, as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com captopril, inibidor não seletivo da enzima conversora de angiotensina (ECA). No grupo controle, a inibição de ECA não alterou a contração

vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 40A,B,C). Entretanto, no grupo CAF, a inibição de ECA diminuiu significativamente o efeito máximo da contração vascular induzida por PE nas aortas com PVAT ao nível encontrado em aortas sem PVAT (Figura 40D,E,F), sugerindo a participação do sistema renina-angiotensina na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

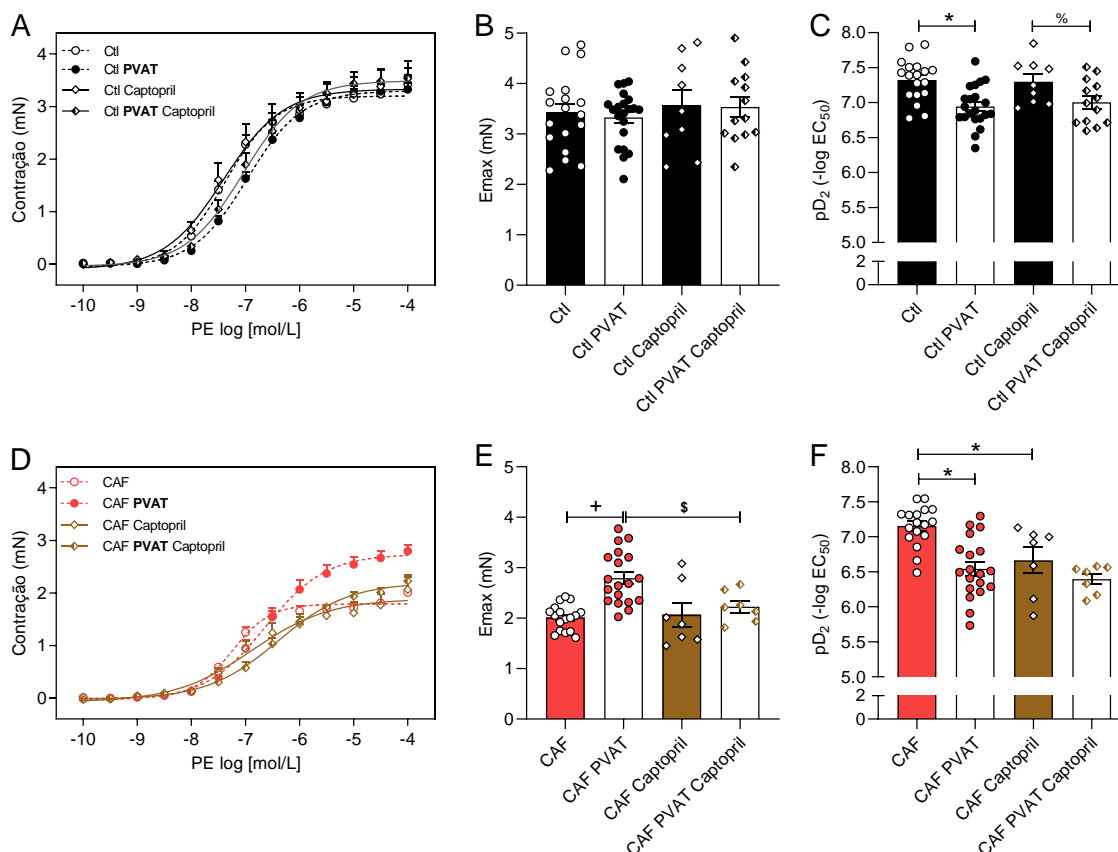


Figura 40 - Inibição da ECA em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com captopril: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD₂ do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD₂ do grupo CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=7-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl captopril. \$Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF PVAT.

Sabendo-se que produtos derivados da ECA estão envolvidos no controle do tônus vascular induzido pelo PVAT em animais que receberam a dieta de cafeteria, o próximo passo foi investigar se a ativação de receptores AT₁, responsável por induzir vasoconstrição e a maioria das respostas biológicas desencadeadas pela

ativação do SRA, estaria relacionada a esse efeito. Para isso, as aortas foram incubadas com losartana, antagonista seletivo dos receptores AT₁. No grupo controle, o antagonismo dos receptores AT₁ não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 41A,B,C). Por outro lado, no grupo CAF, o antagonismo dos receptores AT₁ mostrou diminuir significativamente o efeito máximo da contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT ao nível encontrado em aortas sem PVAT (Figura 41D,E,F), sugerindo a ativação desses receptores na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

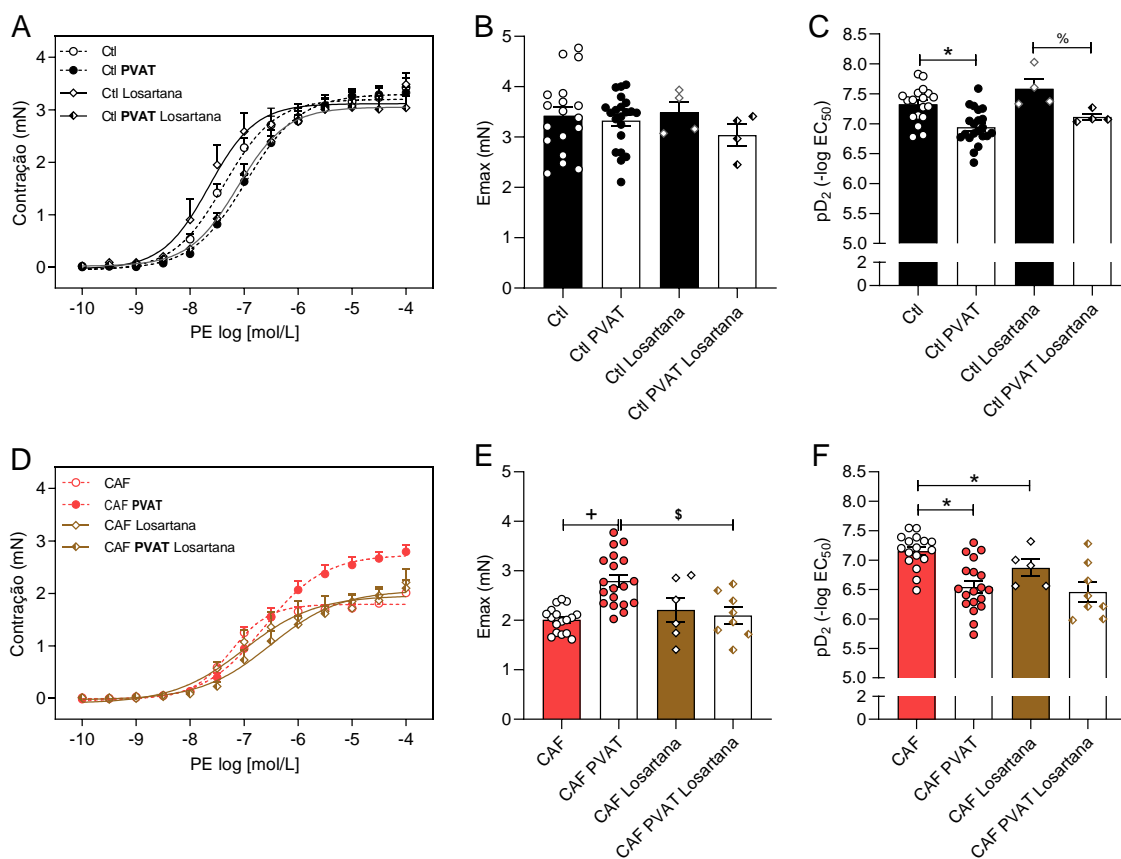


Figura 41 - Antagonismo do receptor AT₁ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com losartana: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD₂ do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD₂ do grupo CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl losartana. \$Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF PVAT.

4.3.4.2 Produção de O_2^-

Sabendo-se que a ativação dos receptores AT_1 é associada ao aumento da produção de O_2^- via ativação da NADPH oxidase (Lassegue et al., 2001), primeiramente, para verificar o envolvimento desses radicais livres na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF, as aortas foram incubadas com tiron, sequestrador de O_2^- . No grupo controle, a incubação prévia com tiron não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 42A,B,C). Entretanto, no grupo CAF, o sequestro de O_2^- diminuiu significativamente a contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT ao nível encontrado em aortas sem PVAT (Figura 42D,E,F), sugerindo haver envolvimento da produção de O_2^- na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

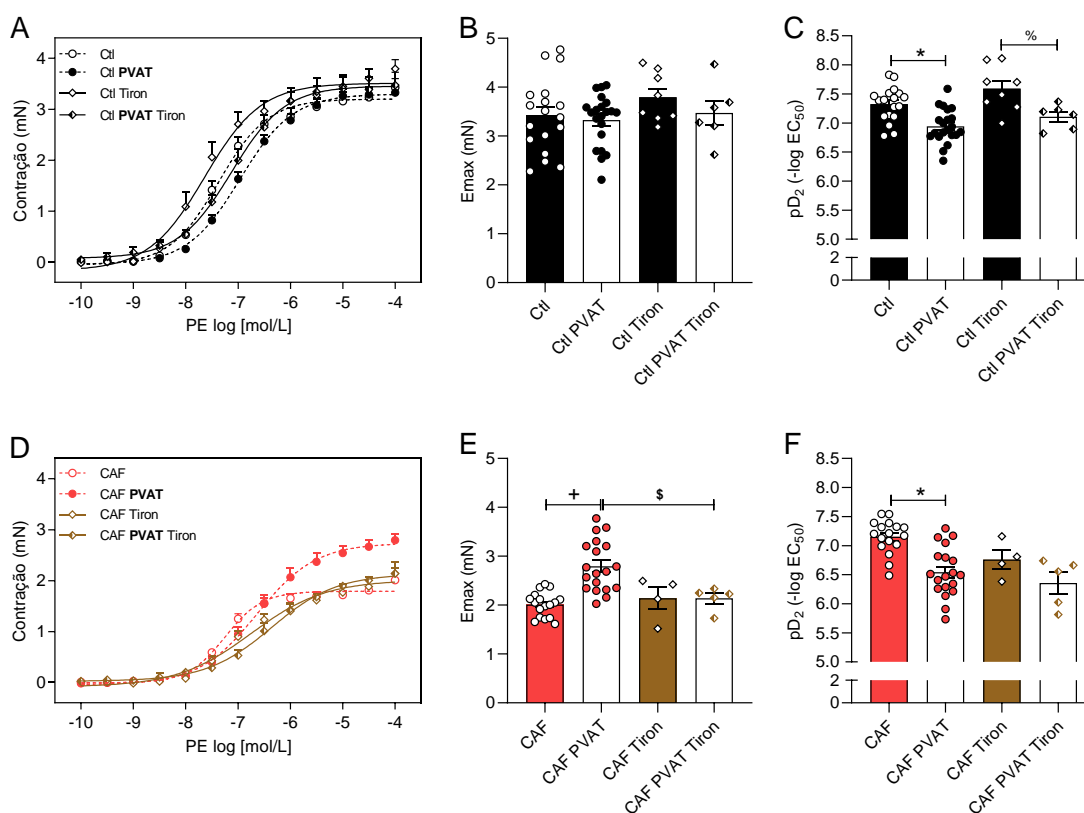


Figura 42 – Sequestro de O_2^- em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com tiron: (A) grupo controle; (B) valores de E_{max} do grupo controle; (C) valores de pD_2 do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de E_{max} do grupo CAF e (F) valores de pD_2 do grupo CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em diferentes preparações ($n=4-21$). *Representa diferença significativa ($P<0.05$) q vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa ($P<0.05$) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa ($P<0.05$) vs. grupo Ctl tiron. §Representa diferença significativa ($P<0.05$) vs. grupo CAF PVAT.

4.3.4.3 Determinação dos Níveis de O_2^-

Visto que a produção de O_2^- participa do aumento da contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT do grupo CAF, os resultados a seguir tiveram como objetivo quantificar os níveis de O_2^- no PVAT. Nas imagens da Figura 43 é possível visualizar o aumento na intensidade de fluorescência no PVAT do grupo CAF (Figura 43B) quando comparado ao grupo controle (Figura 43A), resultado confirmado pela análise quantitativa da intensidade de fluorescência emitida e corrigida pela área (Figura 43C).

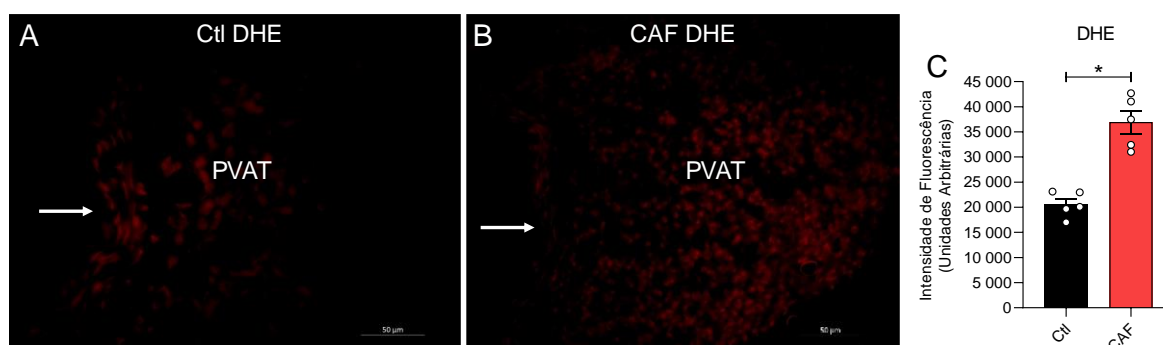


Figura 43 – Produção de O_2^- em aortas com PVAT dos grupos controle e CAF. A quantificação da produção de O_2^- foi realizada *in situ*, mediante exposição das aortas à sonda DHE. (A) Grupo controle; (B) Grupo CAF. As setas indicam a localização da camada endotelial dos vasos sanguíneos. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência. Os valores representam a média \pm EPM obtida em diferentes preparações (n=5). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl.

4.3.4.4 Ativação da NADPH oxidase

Uma vez confirmado o aumento na produção de O_2^- e sua participação na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF, verificamos se a sua produção poderia ser via ativação da NADPH oxidase. Para isso, as aortas foram incubadas com apocinina, inibidor da NADPH oxidase. No grupo controle, a incubação prévia com apocinina não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 44A,B,C). Já no grupo CAF, a inibição da NADPH oxidase diminuiu significativamente a contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT ao nível encontrado em aortas sem PVAT (Figura 44D,E,F), sugerindo o seu envolvimento na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

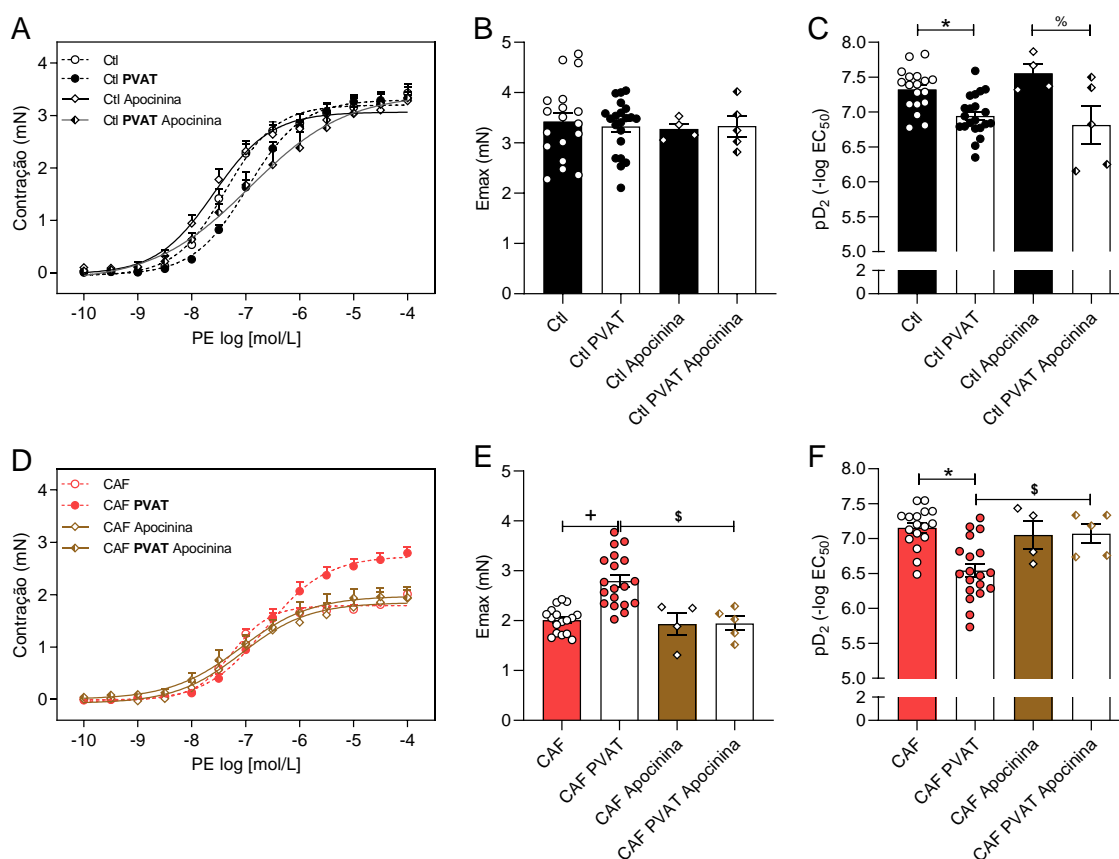


Figura 44 – Inibição da NADPH oxidase em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com apocinina: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD₂ do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD₂ do grupo CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl apocinina. \$Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF PVAT.

4.3.4.5 Ativação da COX

A obesidade desencadeia um processo inflamatório sistêmico de baixo grau que poderia estar associado a alterações na atividade da COX (Sonnweber et al., 2018). Além disso, estudos demonstraram que a produção de ânions superóxido pode ativar a COX (Hernanz et al., 2014). Para verificar se o efeito da dieta de cafeteria sobre o perfil vasoconstritor do PVAT poderia estar associado à ativação da COX, as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com ibuprofeno, inibidor não seletivo da COX. No grupo controle, a incubação prévia com ibuprofeno não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 45A,B,C). Entretanto, no grupo CAF, a inibição da COX diminuiu

significativamente a contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT ao nível encontrado em aortas sem PVAT (Figura 45D,E,F), sugerindo a participação de prostanóides derivados da COX na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

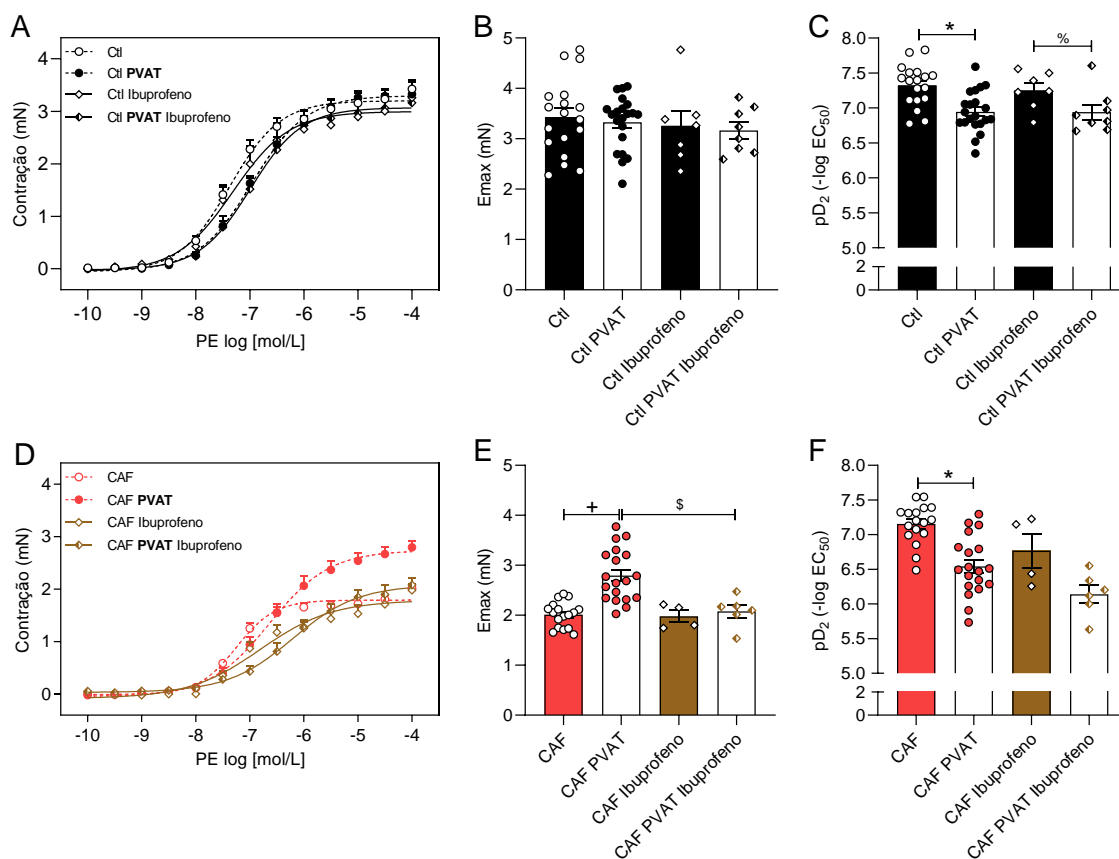


Figura 45 - Inibição da COX em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com ibuprofeno: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD₂ do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD₂ do grupo CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl ibuprofeno. §Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF PVAT.

Para verificar qual seria a isoforma da COX envolvida na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF, primeiramente as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com mofezolac, inibidor seletivo da COX₁. No grupo controle, a incubação prévia com mofezolac não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 46A,B,C). No entanto, no grupo CAF, a inibição da COX₁ diminuiu significativamente a contração

vascular induzida por PE em aortas com PVAT ao nível encontrado em aortas sem PVAT (Figura 46D,E,F), sugerindo a sua participação na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

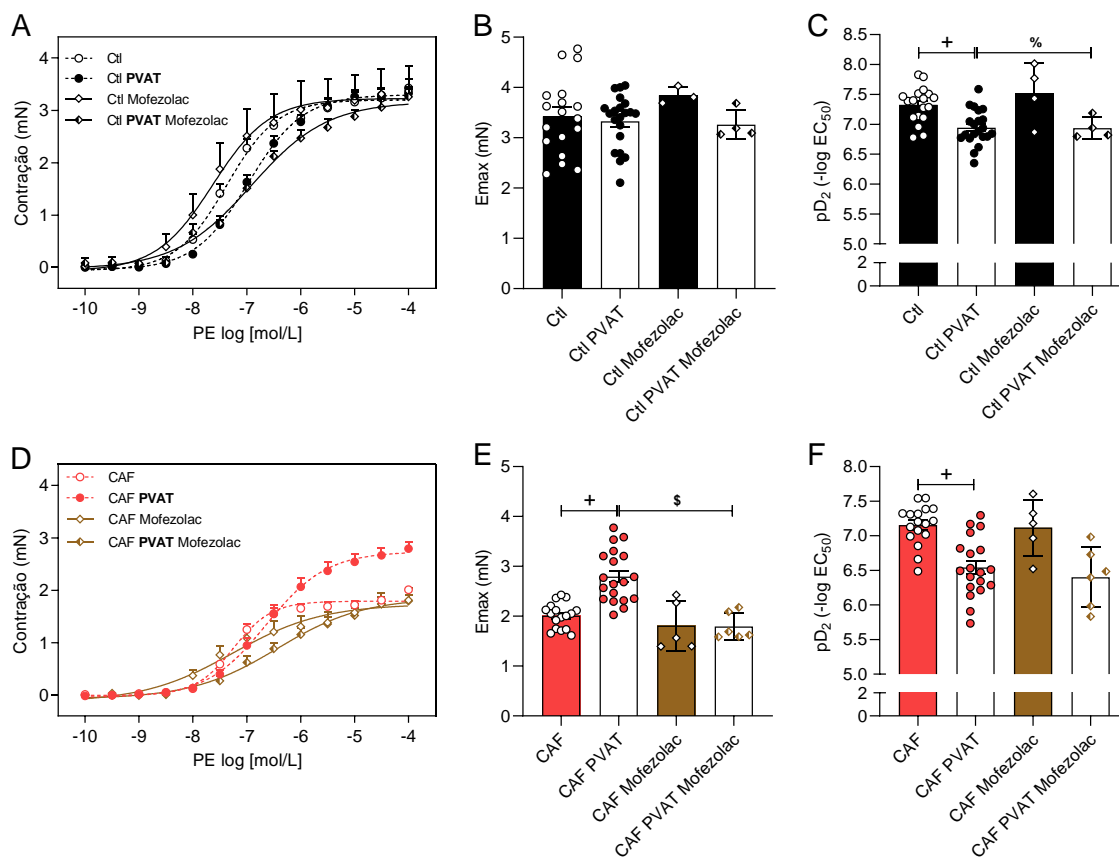


Figura 46 - Inibição seletiva da COX₁ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com mofezolac: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD₂ do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD₂ do grupo CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl mofezolac. §Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF PVAT.

Posteriormente, verificamos se a COX₂ também estaria envolvida na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF. Para isso, as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com nimesulida, inibidor seletivo da COX₂. No grupo controle, a incubação prévia com nimesulida não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 47A,B,C). Diferente dos resultados encontrados após a inibição da COX₁, a inibição da COX₂ não reverteu o

aumento na contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT do grupo CAF (Figura 47D,E,F).

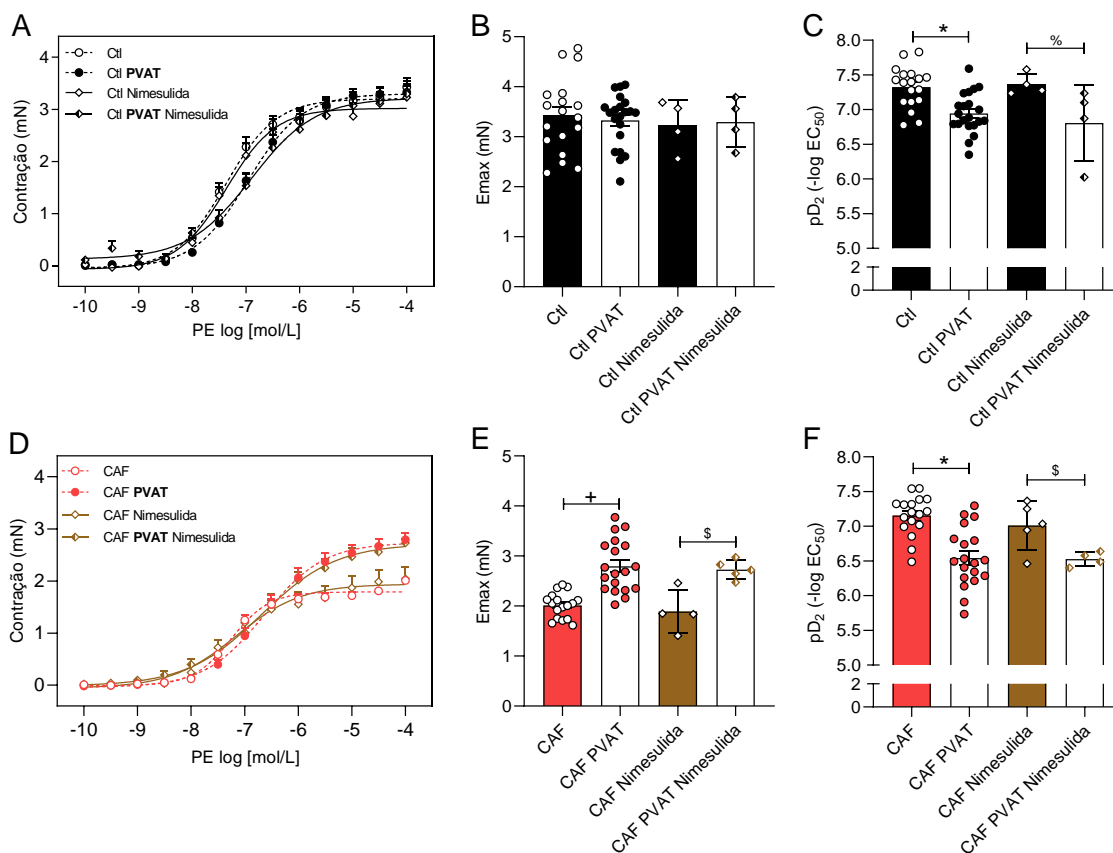


Figura 47 - Inibição seletiva da COX₂ em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF.

Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com nimesulida: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD₂ do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD₂ do grupo CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl nimesulida. \$Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF PVAT.

4.3.4.6 Imunofluorescência das Isoformas da COX

A técnica de imunofluorescência foi realizada com o intuito de verificar se as isoformas da COX estariam localizadas PVAT dos grupos controle e CAF, e avaliar se a dieta de cafeteria poderia alterar a intensidade de fluorescência emitida entre os grupos dependendo da isoforma analisada. A imunomarcagem revelou a presença das isoformas da COX₁ e COX₂ no PVAT dos grupos controle (Figura 48A,D) e CAF (Figura 48B,E). Contudo, a intensidade de fluorescência da COX₁ foi significativamente maior no PVAT do grupo CAF quando comparado ao grupo de

controle (Figura 48A,B), resultado confirmado pela análise quantitativa da intensidade de fluorescência (Figura 48C).

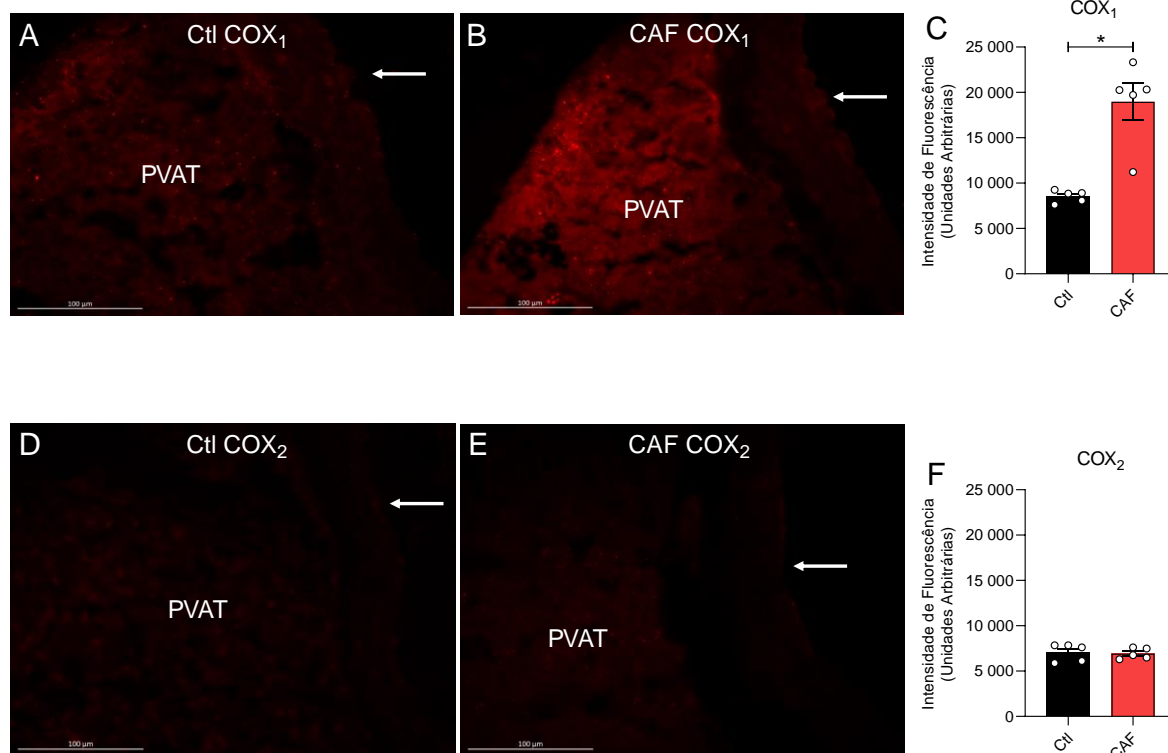


Figura 48 – Imunofluorescência das isoformas da COX₁ e COX₂ no PVAT dos grupos controle e CAF. Imunomarcção das isoformas (A e B) COX₁ e (D e E) COX₂. A intensidade de fluorescência emitida pela ligação do anticorpo secundário seletivo às isoformas (C) COX₁ e (F) COX₂ foi representada no gráfico de barras. Os valores representam a média \pm EPM obtida a partir de diferentes preparações (n=5). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência. As setas indicam a localização da camada endotelial dos vasos sanguíneos.

4.3.4.7 Participação dos Derivados da COX: Prostaglandina F₂ α e Tromboxano A₂

Para verificar quais seriam os possíveis vasoconstritores derivados da COX envolvidos no aumento da contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT do grupo CAF, inicialmente as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com o antagonista do receptor de prostaglandina F₂ α , AH6809. No grupo controle, a incubação prévia com AH6809 não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 49A,B,C). Entretanto, no grupo CAF, o antagonismo do receptor de prostaglandina F₂ α diminuiu significativamente a contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT ao nível encontrado em

aortas sem PVAT (Figura 49D,E,F), sugerindo a sua participação na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

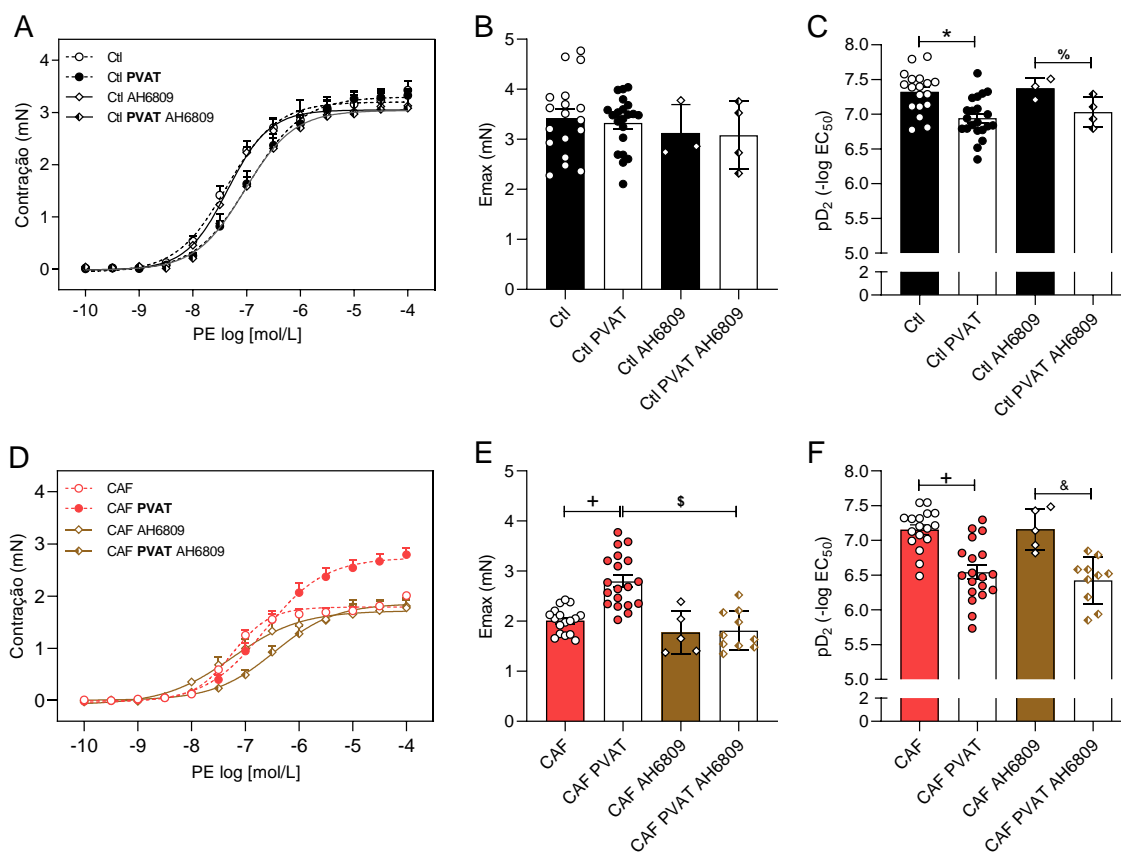


Figura 49 - Antagonismo do receptor de prostaglandina F₂α em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com AH6809: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD₂ do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD₂ do grupo CAF. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=3-21). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl AH6809. \$Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF PVAT. &Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF AH6809.

Em seguida, as aortas dos grupos controle e CAF foram incubadas com o antagonista do receptor de tromboxano A₂, seratrodaste. No grupo controle, a incubação prévia com seratrodaste não alterou a contração vascular induzida por PE na ausência ou presença do PVAT (Figura 50A,B,C). Já no grupo CAF, o antagonismo do receptor de tromboxano A₂ diminuiu significativamente a contração vascular induzida por PE em aortas com PVAT ao nível encontrado em aortas sem PVAT (Figura 50D,E,F), sugerindo a sua participação na resposta vasoconstritora do PVAT em aortas do grupo CAF.

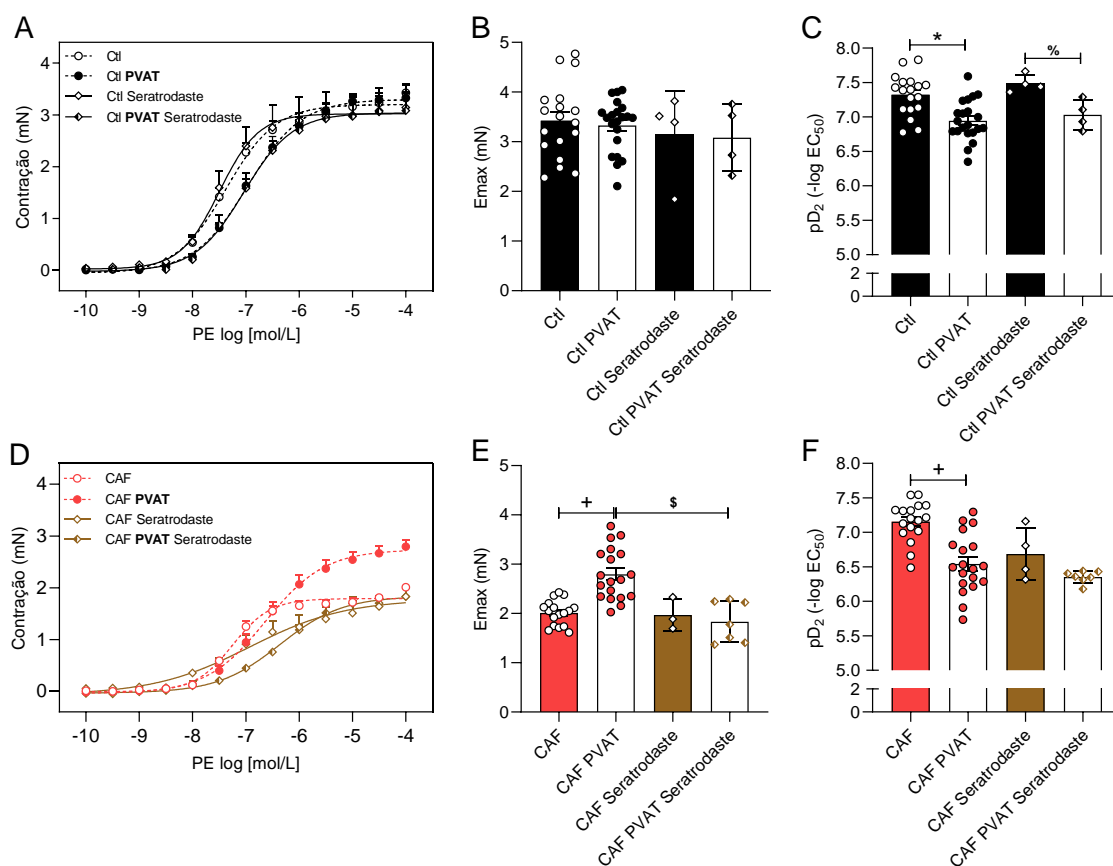


Figura 50 - Antagonismo do receptor de tromboxano A_2 em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE em preparações previamente incubadas ou não com seratrodaste: (A) grupo controle; (B) valores de Emax do grupo controle; (C) valores de pD_2 do grupo controle; (D) grupo CAF; (E) valores de Emax do grupo CAF e (F) valores de pD_2 do grupo CAF. Os valores representam a média \pm EPM obtida em diferentes preparações (n=4-21). *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo CAF. %Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl seratrodaste. \$Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo CAF PVAT.

4.4 Tratamento Dietético

Com o intuito de verificar se as principais alterações metabólicas e cardiovasculares encontradas após a administração da dieta de cafeteria por 4 semanas seriam reversíveis ou não, os animais do grupo CAF-tratado foram alimentados com dieta de cafeteria por 4 semanas consecutivas e, posteriormente, alternaram a dieta para a dieta padrão para roedores por mais 4 semanas. Os resultados demonstraram que o tratamento dietético foi capaz de reverter o aumento do peso corporal (Figura 51A) e do índice de adiposidade (Figura 51B) ao final das 8 semanas em estudo.

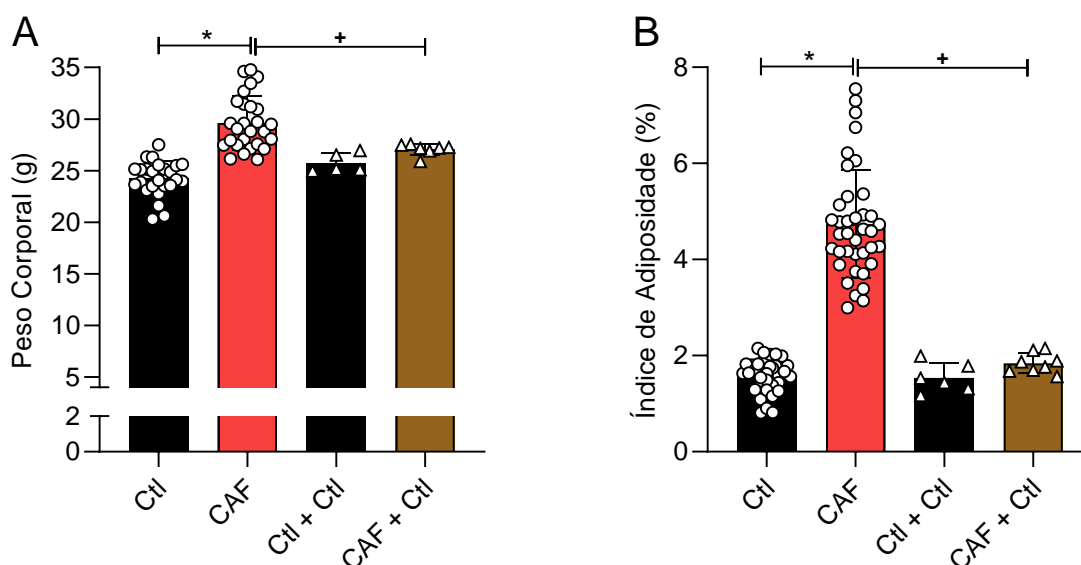


Figura 51 - Avaliação do (A) peso corporal e (B) índice de adiposidade dos grupos controle e CAF-tratado. Os valores representam a média \pm EPM obtida em um n de 6-35 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa ($P < 0.05$) vs. grupo CAF.

Além disso, a técnica de Langendorff utilizada para avaliar a função cardíaca demonstrou que a pressão de perfusão do coração (Figura 52A), bem como a função contrátil basal do ventrículo esquerdo, verificada por meio da pressão exercida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) (Figura 52B) e por meio da razão da derivada da pressão pela derivada do tempo (dP/dt) máxima (Figura 52C) e mínima (Figura 52D), foram reestabelecidas no grupo CAF-tratado aos níveis encontrados no grupo controle.

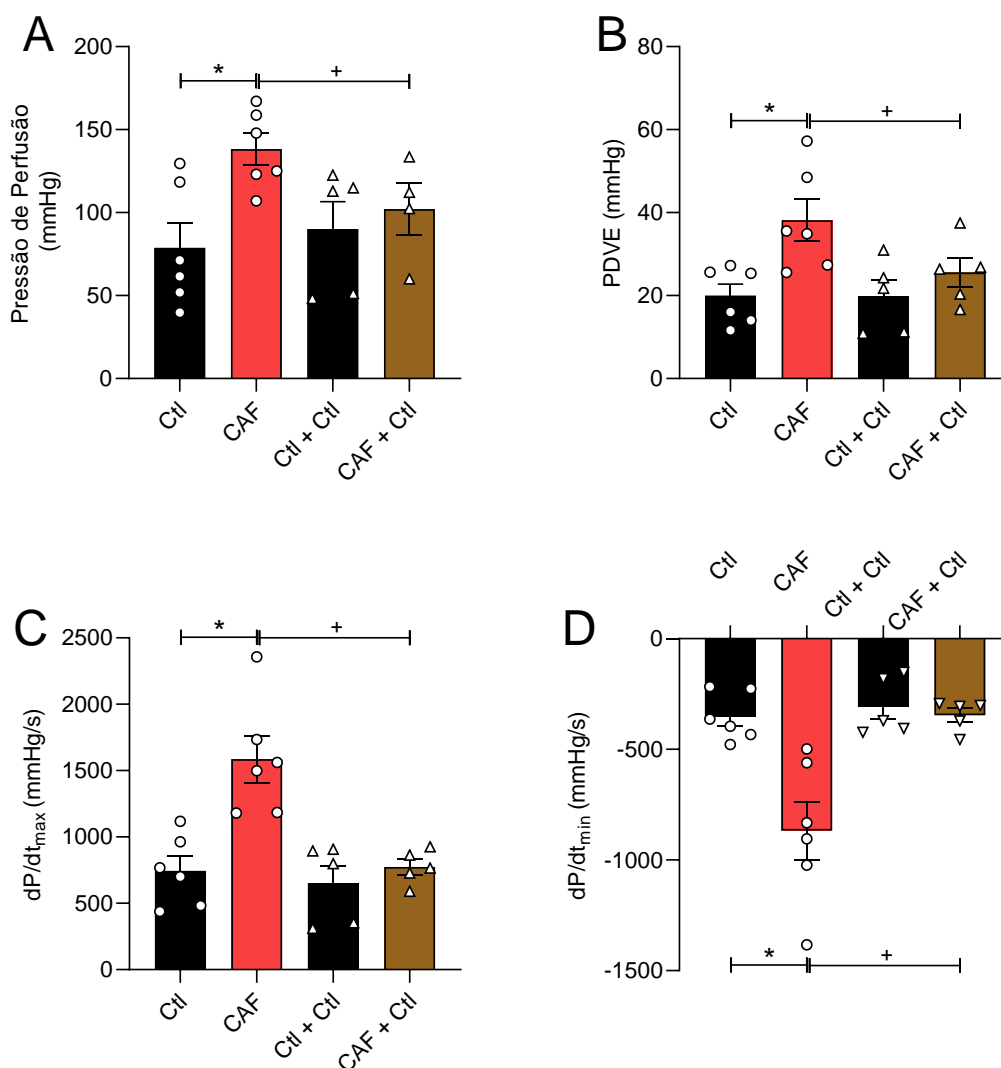


Figura 52 - (A) Pressão de perfusão do coração; (B) Pressão exercida pelo ventrículo esquerdo (PDVE); (C) dP/dt_{max} e (D) dP/dt_{min}. Os valores representam a média ±EPM obtida em um n de 4-6 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF.

Quando o coração foi desafiado por meio do estresse farmacológico com isoprenalina, o grupo CAF-tratado apresentou aumento significativo da resposta à isoprenalina, alcançando os níveis encontrados no grupo controle (Figura 53A,B). O mesmo resultado foi observado para dP/dt_{max} (Figura 53C) e dP/dt_{min} (Figura 53D) quando estimulados com isoprenalina.

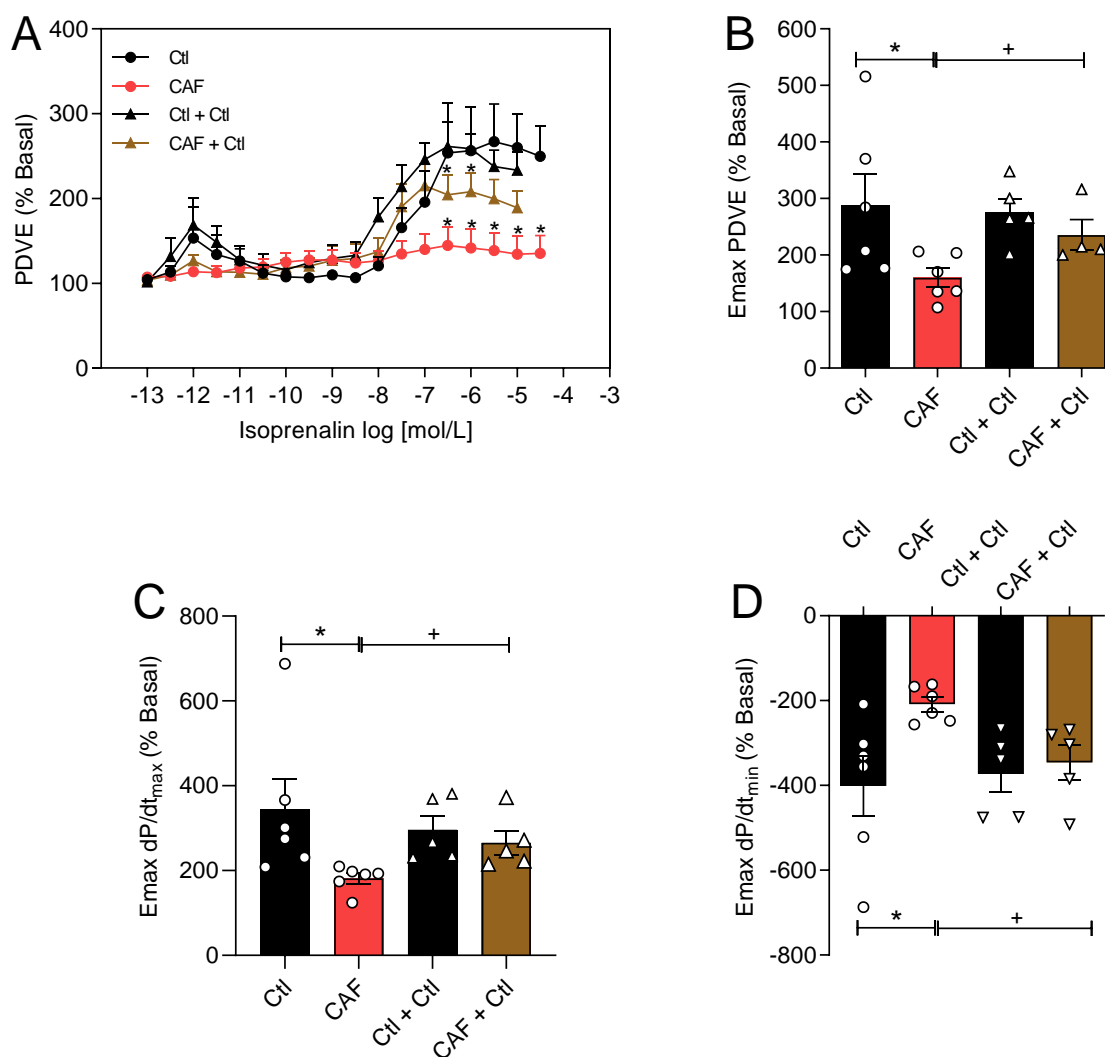


Figura 53 - (A) % de mudança da PDVE frente ao estímulo com isoprenalina; (B) Emax da % de mudança frente ao estímulo com isoprenalina; (C) dP/dt_{max} e (D) dP/dt_{min} frente ao estímulo com isoprenalina. Os valores representam a média ±EPM obtida em um n de 4-8 animais para cada grupo estudado. *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF.

A resposta de contração vascular frente ao estímulo com PE também foi avaliada após o tratamento dietético. No grupo controle, conforme anteriormente observado, a presença do PVAT não alterou o efeito máximo de contração vascular induzido por PE (Figura 54A,B). Entretanto, a potência de contração permaneceu significativamente reduzida na presença do PVAT, representado pelo deslocamento à direita da curva concentração-resposta induzida por PE (Figura 54A,C). Por outro lado, no grupo CAF-tratado, foi observado aumento significativo no efeito máximo da contração e potência vascular induzido por PE tanto na ausência quanto na

presença do PVAT (Figura 54D,E,F), revertendo por completo o prejuízo na contratilidade vascular anteriormente observado no grupo CAF ao nível obtido no grupo controle (Figura 54K,L,M).

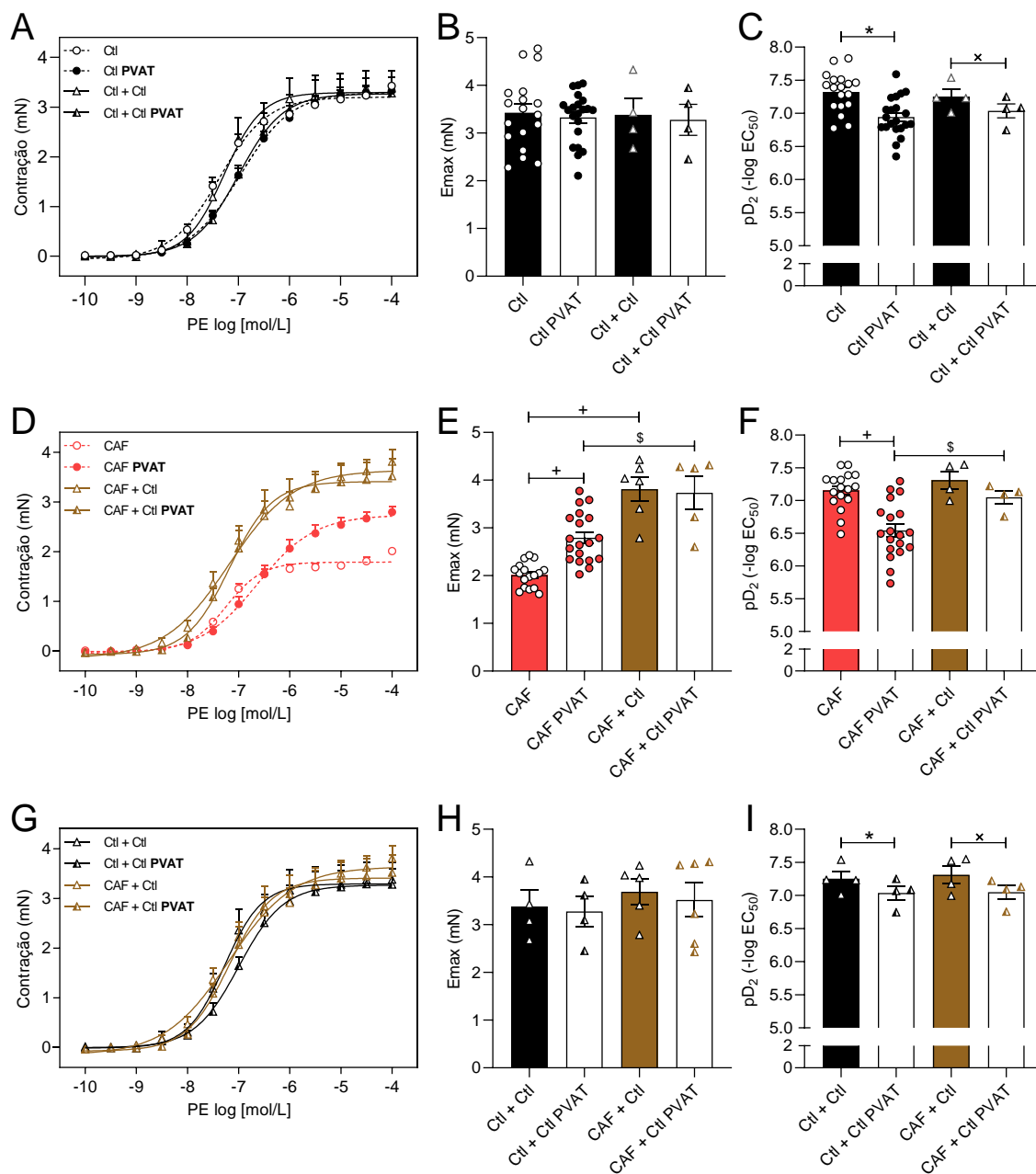


Figura 54 - Contração vascular induzida por PE em aortas com e sem PVAT dos grupos controle e CAF-tratado. Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a resposta contrátil induzida por PE nos grupos (A) controle e (D) CAF-tratado; (G) sobreposição dos resultados encontrados nos grupos controle e CAF-tratado; valores de Emax dos grupos (B) controle e (E) CAF-tratado; valores de pD₂ dos grupos (C) controle e (F) CAF-tratado; sobreposição dos valores de (H) Emax e (I) pD₂ dos grupos controle e CAF-tratado. Os valores representam a média ±EPM obtida em diferentes preparações (n=4-6). *Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl. #Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo Ctl PVAT. +Representa diferença significativa (P<0.05) vs. grupo CAF.

5 Discussão

Ao longo dos últimos 40 anos, a obesidade vem alcançando proporções epidêmicas em todo o mundo, se tornando um importante problema de saúde pública (World Health Organization - WHO, 2016). Diversos estudos têm demonstrado que a típica dieta ocidental, rica lipídeos e carboidratos refinados, é em grande parte responsável pela crescente epidemia da obesidade (Ferreira et al., 2011; Azevedo and Brito, 2012; Gregersen et al., 2012; Barrett et al., 2016). Nesse contexto, o uso de diferentes intervenções dietéticas em modelos animais, incluindo as dietas do tipo “*high fat*”, “*high carbohydrate*” e cafeteria, representam valiosas ferramentas experimentais para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da obesidade e doenças relacionadas (Pinheiro-Castro et al., 2019). Contudo, é necessário ressaltar que cada modelo de obesidade induzida por dieta apresenta suas vantagens e limitações. Dessa forma, ao induzir obesidade em modelos experimentais, é importante considerar que os efeitos observados podem variar dependendo da composição da dieta utilizada, do período experimental em estudo e da linhagem animal escolhida. Assim, comparações entre outros estudos devem ser feitas com cuidado.

No presente estudo, a dieta de cafeteria foi escolhida como modelo de obesidade induzida por dieta por refletir com maior precisão a variedade de alimentos altamente calóricos prevalentes na sociedade ocidental e por induzir obesidade e distúrbios metabólicos relacionados de maneira mais eficiente (Bortolin et al., 2018), permitindo avaliar os seus efeitos a curto prazo sobre o metabolismo e o sistema cardiovascular. Os resultados encontrados demonstraram que a dieta de cafeteria por apenas 4 semanas mostrou ser um modelo robusto de obesidade e síndrome metabólica induzido por dieta, como evidenciado pelo aumento significativo do peso corporal e do índice de adiposidade, hiperglicemia, intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperlipidemia e acúmulo de gordura ectópica no fígado.

Trabalhos na literatura também têm demonstrado a relevância da dieta de cafeteria em induzir obesidade em roedores à longo prazo, até mesmo em maior escala do que as clássicas dietas “*high fat*”. Sampey et al. (2011) e Zeeni et al. (2015) mostraram, em um estudo comparativo, que a dieta de cafeteria induziu rápido aumento do peso corporal associado ao aumento do índice de adiposidade,

maiores níveis séricos de colesterol, bem como níveis mais altos de insulina e menor tolerância à glicose em comparação à dieta *“high fat”* após um período de 15 semanas (Sampey et al., 2011; Zeeni et al., 2015). Mais recentemente, Lang et al. (2019) relataram também em um estudo comparativo que ambas as dietas de cafeteria e *“high fat”* foram capazes de induzir obesidade, intolerância à glicose e resistência à insulina de maneira semelhante ao longo de 12 semanas (Lang et al., 2019).

Embora a dieta de cafeteria seja considerada um modelo de obesidade induzida por dieta eficiente por induzir obesidade e distúrbios metabólicos relacionados de maneira mais rápida e refletir com maior precisão a variedade de alimentos altamente calóricos prevalentes na sociedade ocidental, esse tipo de dieta possui como limitação a sua difícil padronização em termos de conteúdo nutricional que podem variar de região para região (Moore, 1987; Bortolin et al., 2018). Além disso, por ser composta por alimentos altamente processados, a dieta de cafeteria contém diversos aditivos alimentares, como conservantes, corantes, aromatizantes, antioxidantes artificiais e emulsificantes normalmente encontrados em alimentos industrializados, sendo assim considerada uma ferramenta valiosa se o objetivo da pesquisa for investigar os efeitos do consumo excessivo de alimentos calóricos altamente processados e produzidos industrialmente, característicos da sociedade ocidental (Bortolin et al., 2018).

Como abordado anteriormente, a expansão do tecido adiposo na obesidade leva à inflamação crônica sistêmica de baixo grau, caracterizada pelo aumento moderado de adipocinas pró-inflamatórias circulantes que contribuem para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e doenças relacionadas (Mraz and Haluzik, 2014). Quando avaliados os níveis séricos das adipocinas, os resultados encontrados demonstraram que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria induziu aumento significativo nos níveis séricos de leptina quando comparado ao grupo controle, sem alterações nos níveis séricos de adiponectina, quemerina e resistina.

A leptina foi a primeira adipocina secretada pelos adipócitos a ser caracterizada, desempenhando importante papel na regulação da ingestão alimentar e no metabolismo energético por meio de sua ação hipotalâmica no sistema nervoso central, levando à supressão do apetite, controlando a saciedade e aumentando o

metabolismo energético (Zhang et al., 1994). As concentrações plasmáticas de leptina são geralmente diretamente correlacionadas com o aumento da adiposidade (Campfield et al., 1996). Assim, a obesidade é caracterizada por altos níveis circulantes de leptina (hiperleptinemia), um paradoxo associado a um mecanismo compensatório para superar a resistência à leptina induzida pela obesidade, explicada em parte pelo aumento nos níveis do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3), um inibidor da sinalização desencadeada pela leptina (Enriori et al., 2006; Landecho et al., 2019).

A leptina atua por meio da sua interação com os receptores ObR (também chamado LepR) que pertencem à superfamília de receptores de citocinas de classe I (Tartaglia et al., 1995). Existem seis isoformas diferentes do receptor ObR com domínios de ligação extracelular idênticos, mas com domínios citoplasmáticos de comprimentos diferentes. Essas isoformas incluem uma forma solúvel (ObRe), quatro formas curtas (ObRa, ObRc, ObRd e ObRf) e uma forma longa (ObRb) (Tartaglia et al., 1995; Bjørnbæk et al., 1997). O receptor ObRb é a isoforma mais importante para a transdução de sinal intracelular induzida pela leptina, estando fortemente expresso no hipotálamo e no tecido adiposo, em órgãos como rim, fígado, pâncreas, intestino e pulmão, bem como também foi demonstrado ser expresso no sistema cardiovascular, incluindo cardiomiócitos, células do músculo liso vascular e células endoteliais (Joffin et al., 2012; Ghantous et al., 2015; Kang et al., 2020).

Diversos estudos têm se dedicado a investigar a associação entre os níveis circulantes de leptina e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Foi demonstrado uma associação positiva entre as concentrações de leptina e o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial por meio da hiperativação do sistema nervoso simpático aumentando a liberação de catecolaminas, sugerindo que a hiperleptinemia contribui para a hipertensão arterial associada à obesidade (Rahmouni et al., 2002, 2005; Simonds et al., 2012, 2014; Bell and Rahmouni, 2016; Kang et al., 2020). No entanto, apesar da resistência comumente existente aos efeitos metabólicos da leptina na obesidade, alguns autores sugerem que essa resistência ocorreria de maneira seletiva, de forma que a ativação simpática induzida pela leptina seria preservada (Mark et al., 2002). Quando avaliado o impacto da obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria sobre o sistema cardiovascular,

nossos achados demonstraram que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria induziu aumento da pressão arterial sistólica a partir da segunda semana em estudo quando comparada ao grupo controle, mantendo-se elevada até o final da quarta semana de dieta, sugerindo uma possível contribuição dos níveis séricos elevados de leptina no aumento da pressão arterial no grupo CAF. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados para confirmar essa relação.

A obesidade está associada ao aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular, em parte pelo desenvolvimento de hipertensão arterial que representa a principal causa de doenças cardiovasculares e morte prematura em todo o mundo, incluindo aterosclerose, acidente vascular encefálico, fibrilação atrial, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio e morte súbita cardíaca (Poirier et al., 2006; Mandviwala et al., 2016; Koliaki et al., 2018). No presente estudo, para avaliarmos as alterações cardíacas induzidas pela obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria, experimentos de eletrocardiograma, função cardíaca e contratilidade de cardiomiócitos foram realizados.

A análise do eletrocardiograma revelou que, embora o grupo CAF tenha apresentado ritmo sinusal e eixo cardíacos comparáveis ao grupo controle, foi observado um prolongamento do intervalo PR, período que compreende o início da onda P ao início do complexo QRS que corresponde ao tempo em que o impulso cardíaco gerado no nodo sinusal leva para despolarizar os átrios e percorrer as vias de condução internodais até alcançar o nodo atrioventricular para dar início a despolarização dos ventrículos (Guyton and Hall, 2011). Assim, o prolongamento do intervalo PR caracteriza um atraso na condução atrioventricular, podendo constituir um bloqueio atrioventricular de primeiro grau que apesar de ser geralmente assintomático, representa um risco aumentado de desenvolver fibrilação atrial e bloqueios atrioventriculares de alto grau (Oldroyd and Makaryus, 2019).

Podemos sugerir que o prolongamento do intervalo PR observado no grupo CAF seja indicativo que haja modulação de um ou mais dos seguintes fatores: Redução dos canais para sódio Nav 1.5 que conduzem a fase inicial de despolarização do potencial de ação cardíaco e, portanto, determinam criticamente a condução da excitação por meio do coração (Papadatos et al., 2002); redução do acoplamento juncional via junções GAP que consistem em grupos de canais de membrana que permitem o acoplamento elétrico entre as células do músculo

cardíaco (SEVERS, 1994); alteração estrutural nas vias de condução intra-atriais (James A., 2019). Além disso, a clara tendência de aumento na amplitude da onda P ($P = 0.07$) é normalmente associada à hipocalcemia, mas também pode indicar hipertrofia atrial, particularmente do lado direito (Oldroyd and Makaryus, 2019). Em conjunto, esses fatores poderiam pré-dispor o desenvolvimento de problemas de condução e arritmias de reentrada em circuitos supraventriculares.

Visto que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria levou a alterações no eletrocardiograma, foi então avaliado se essas alterações teriam impacto sobre a função cardíaca do grupo CAF. Nossos achados inicialmente revelaram um aumento significativo da pressão de perfusão do coração no grupo CAF, sugerindo aumento da resistência vascular oferecida pelas artérias coronárias. Por outro lado, de maneira interessante, a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria induziu aumento da pressão exercida pelo ventrículo esquerdo basal, acompanhado pelo aumento da dP/dt máxima e mínima, refletindo maiores atividades inotrópica e lusitrópica cardíacas. Esses achados corroboram com os resultados encontrados a nível celular em que a velocidade de contração/relaxamento dos cardiomiócitos em conjunto com a maior área de encurtamento celular foi significativamente maior no grupo CAF em comparação ao grupo controle.

A princípio, as alterações na função cardíaca observadas no grupo CAF refutaram a hipótese que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria levaria à insuficiência cardíaca. Contudo, o desenvolvimento da insuficiência cardíaca geralmente envolve um período compensatório adaptativo em que os sinais neuro-humorais fisiológicos aumentam as cargas hemodinâmicas que elevam as pressões de enchimento ventricular, o que aumenta a capacidade de bombeamento inerente do coração ao alongar os cardiomiócitos (Hanft et al., 2017). Dessa forma, é encontrado um aumento dos parâmetros de análise da função cardíaca, o que soa diferente do esperado. Contudo, a regulação positiva desses processos fisiológicos inicialmente compensatória, frequentemente no decorrer do tempo evolui para a redução significativa dos mesmos parâmetros antes avaliados (Hanft et al., 2017).

Ao avaliarmos o impacto da obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria sobre a função cardíaca frente ao estímulo farmacológico estressor induzido pela isoprenalina, nossos achados demonstraram a diminuição da pressão exercida pelo

ventrículo esquerdo no grupo CAF, acompanhado pela diminuição da dP/dt máxima e mínima, compreendendo alterações opostas às respostas anteriormente observadas no basal. Assim, sugerimos que as alterações na função cardíaca observadas no grupo CAF no basal poderiam refletir uma característica compensatória adaptativa encontrada na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria à curto prazo, e o prenúncio de uma insuficiência cardíaca caso a dieta seja ofertada à longo prazo.

Trabalhos na literatura demonstraram que dietas do tipo *“high fat”* e *“high carbohydrate”* à longo prazo foram capazes de desencadear alterações cardiovasculares que incluíam aumento da pressão arterial sistólica e disfunção endotelial, juntamente com inflamação, fibrose, hipertrofia, rigidez aumentada e repolarização retardada no ventrículo esquerdo após um período de 16 semanas (Panchal et al., 2011; Alam et al., 2013). Alterações cardiovasculares semelhantes foram encontradas em um estudo comparativo realizado entre as dietas *“high fat”*, *“high carbohydrate”* e cafeteria ao longo de 15 semanas (Zeeni et al., 2015). Nesse estudo, os autores encontraram que a dieta de cafeteria desencadeou esteatose cardíaca, fibrose miocárdica e hipertrofia dos cardiomiócitos em níveis mais altos em comparação com as dietas *“high fat”* e *“high carbohydrate”* (Zeeni et al., 2015).

Nossos achados também revelaram que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria aumentou o peso do coração, sem que houvesse alterações na área dos cardiomiócitos, sugerindo que possivelmente poderia haver hipertrofia do ventrículo esquerdo devido à maior produção de fibras de colágeno entre as células levando à fibrose e remodelamento cardíaco. Contudo, experimentos histológicos seriam necessários para confirmar essas alterações.

Em conjunto, nossos achados revelaram que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria por apenas 4 semanas pré-dispõe arritmias e alterações na função cardíaca que poderiam caminhar para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. As alterações cardíacas encontradas no grupo CAF poderiam ser resultantes do prejuízo induzido pela obesidade diretamente no coração e/ou alterações adaptativas frente às alterações sistêmicas de aumento da pressão arterial sistólica, dislipidemia e intolerância oral à glicose, também desencadeadas pela dieta de cafeteria.

Posteriormente, foi avaliado qual seria o impacto da obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria sobre a contratilidade e o relaxamento vascular da aorta torácica dissecada do tecido adiposo circundante. Nossos achados demonstraram um perfil hiporresponsivo na reatividade vascular aórtica frente ao estímulo vasoconstritor induzido por PE, sem alterações na vasodilatação induzida por ACh. Esses achados refutaram a hipótese de que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria iria provocar disfunção endotelial, com prejuízo no relaxamento vascular e aumento da vasoconstrição, sugerindo que a hiporresponsividade aórtica observada possa ser uma característica adaptativa compensatória com o objetivo de preservar a função vascular em um quadro de obesidade à curto prazo. Fulop et al. (2007), foram pioneiros em sugerir que a obesidade pode levar à ativação de mecanismos vasculares adaptativos para manter/melhorar a função dos vasos sanguíneos, como o aumento na produção de NO, um potente agente vasodilatador (Fulop et al., 2007).

Assim, considerando que mecanismos adaptativos poderiam estar envolvidos na hiporresponsividade aórtica observada no grupo CAF, uma nova hipótese foi levantada. Visto que os níveis séricos de leptina se encontravam elevados no grupo CAF, foi então investigado se a via de sinalização ativada pelos receptores ObR poderia estar relacionada à significativa diminuição da vasoconstrição no grupo CAF, uma vez que estudos *in vitro* demonstraram que a leptina também pode ter ações periféricas, como a vasodilatação mediada pelo endotélio levando a produção de NO, a qual poderia se opor à hipertensão arterial coexistente induzida pela hiperativação simpática (Rahmouni and Haynes, 2004; Mattu and Randeva, 2013). O silenciamento dos receptores da leptina foi capaz de restabelecer a contratilidade aórtica no grupo CAF, sugerindo sua importante contribuição para a hiporresponsividade aórtica observada.

A primeira demonstração de que a leptina poderia induzir a produção de NO surgiu do trabalho pioneiro de Yu et al. (1997) e Wang et al. (1998) em estudos envolvendo a glândula pituitária e as ilhotas pancreáticas (Yu et al., 1997; Wang et al., 1998). Posteriormente, diversos estudos demonstraram que a leptina estimula a síntese de NO em diferentes tecidos, incluindo na vasculatura (Rodríguez et al., 2007).

O NO é produzido por três isoformas diferentes da enzima NO sintase (NOS), inicialmente nomeadas com relação à sua localização nos tecidos: NOS neuronal (nNOS ou NOS I), NOS induzida (iNOS ou NOS II) e NOS endotelial (eNOS ou NOS III) (Förstermann and Sessa, 2012). O NO formado pela NOS é capaz de atuar em uma série de enzimas e proteínas alvo. Contudo, a via de sinalização fisiológica mais importante estimulada pelo NO é a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), geração de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e ativação da proteína quinase G, que em células musculares lisas leva à vasodilatação, tendo papel de grande importância no controle do tônus vascular (Förstermann and Sessa, 2012).

Estudos demonstraram que em concentrações fisiológicas normais, a leptina exerce efeitos vasoprotetores ao melhorar a função endotelial como resultado da produção aumentada de NO por meio da ativação da via de fosforilação PI3K/Akt/eNOS ou por meio da ativação dependente de adenosina monofosfato quinase (AMPK)/eNOS (Beltowski, 2012; Stern et al., 2016; Koliaki et al., 2018; Landecho et al., 2019). Contudo, a hiperleptinemia encontrada na obesidade geralmente leva à efeitos vasculares opostos, visto que seus efeitos estimulantes sobre a ativação da enzima eNOS e a produção de NO estariam prejudicadas devido à resistência à leptina (Beltowski, 2012; Landecho et al., 2019). Além disso, a hiperleptinemia também foi mostrada induzir estresse oxidativo, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio, consideradas um mediador chave da disfunção endotelial ao reduzir a biodisponibilidade de NO (Bouloumié et al., 1999; Hare and Stamler, 2005; Beltowski, 2012).

Nossos achados demonstraram que a significativa redução da contratilidade vascular observada no grupo CAF foi também relacionada à ativação das enzimas PI3K e eNOS, e ao aumento na biodisponibilidade de NO na aorta torácica, sugerindo que a via de sinalização PI3K/Akt/eNOS ativada pelo receptor da leptina poderia estar envolvida na hiporresponsividade aórtica no grupo CAF. Quando avaliada a participação das isoformas neuronal e induzida da NOS, a incubação com seus respectivos inibidores farmacológicos não foi capaz de reverter a significativa redução da contratilidade vascular encontrada no grupo CAF, sugerindo que a isoforma eNOS seria a principal responsável pelo aumento na produção de NO. Esses resultados corroboraram com os ensaios de imunofluorescência que

mostraram aumento da intensidade de fluorescência apenas da isoforma eNOS em aortas do grupo CAF.

Assim, a relação entre a hiperleptinemia encontrada na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria e o sistema cardiovascular seria aparentemente controversa ao desempenhar efeito vasodilatador associado à produção de NO. Contudo, uma possível explicação plausível poderia ser atribuída aos efeitos agudos e crônicos da leptina na vasculatura (Mattu and Randeve, 2013). À curto prazo, o aumento nos níveis circulantes de leptina na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria poderia contribuir para a ativação da via de fosforilação PI3K/Akt/eNOS levando ao aumento na produção de NO e consequente diminuição da contratilidade aórtica. Porém, à longo prazo, poderia haver resistência à leptina na vasculatura, levando ao prejuízo do seu efeito vasoprotetor.

Dando sequência na investigação sobre quais mecanismos estariam envolvidos na significativa redução da contratilidade vascular encontrada no grupo CAF, foi avaliado qual seria o papel do endotélio vascular na hiporresponsividade aórtica observada. A cuidadosa retirada das células endoteliais nas preparações de reatividade vascular também foi capaz de restabelecer contratilidade vascular no grupo CAF, sugerindo sua importante contribuição nas alterações vasculares induzidas pela obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria. O endotélio vascular tem sua importância amplamente reconhecida como órgão modulador do tônus vascular, responsável pela síntese e liberação tanto de fatores de relaxamento quanto de fatores contráteis derivados do endotélio (Rubanyi, 1991). Além do NO, outros fatores de relaxamento derivados do endotélio investigados foram a endotelina, que ao interagir com os receptores ET_B localizados no endotélio pode levar a vasodilatação (Vignon-Zellweger et al., 2012), e prostanóides vasodilatadores derivados da COX (Edwards et al., 2010). No entanto, o antagonismo do receptor ET_B e a inibição da COX não foram capazes de restabelecer a contratilidade vascular no grupo CAF (resultados não mostrados), descartando a contribuição desses fatores na hiporresponsividade aórtica observada.

Outro potente agente vasodilatador que demonstrou ter sua biodisponibilidade aumentada na aorta torácica do grupo CAF foi o H₂O₂. Contudo, sua participação na hiporresponsividade aórtica observada foi apenas parcial, sugerindo uma possível contribuição à significativa redução da contratilidade aórtica encontrada no grupo

CAF em conjunto com o NO, uma vez que a inibição simultânea da NOS e da produção de H₂O₂ foi capaz de restabelecer por completo o efeito máximo e a potência da contratilidade vascular no grupo CAF. Embora nossos achados não tenham identificado a fonte enzimática de H₂O₂, sugerimos que a sua produção seria advinda das células endoteliais, visto que o H₂O₂ é considerado um dos fatores de hiperpolarização derivado do endotélio capaz de induzir vasodilatação em diversos leitos vasculares, desempenhando papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular (Matoba et al., 2000; Matoba and Shimokawa, 2003; Shimokawa and Matoba, 2004).

Em conjunto, nossos achados revelaram que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria por apenas 4 semanas levou a um perfil hiporresponsivo da aorta torácica dissecada do tecido adiposo circundante frente ao estímulo vasoconstritor induzido por PE. Sugerimos que esse efeito se deve, em parte, ao aumento nos níveis séricos de leptina e ativação da via de sinalização PI3K/Akt/eNOS ativada pelo receptor ObR levando ao aumento na produção de NO, e parcialmente atribuído ao aumento de H₂O₂ nas células endoteliais. O aumento na produção desses dois potentes fatores vasodilatadores derivados do endotélio poderia estar relacionado à um mecanismo adaptativo compensatório na tentativa de preservar a função vascular em um quadro de obesidade à curto prazo.

Posteriormente, nossos achados se dedicaram a investigar qual seria o impacto do tecido adiposo que circunda os vasos sanguíneos (PVAT) sobre o perfil hiporresponsivo observado na aorta torácica do grupo CAF anteriormente discutido. O PVAT está intimamente relacionado ao sistema cardiovascular, exercendo importante influência sobre os vasos sanguíneos, podendo se relacionar a progressão ou regressão de doenças cardiovasculares relacionadas à obesidade devido a sua plasticidade ao responder a diferentes situações fisiológicas e fisiopatológicas por meio de mudanças fenotípicas, como morfologia ou balanço de fatores vasoativos por ele liberados (Gálvez-Prieto et al., 2012). Assim, a compreensão dessa relação, obesidade-PVAT, vem sendo amplamente investigada objetivando identificar as moléculas bioativas secretadas pelo PVAT nessas condições.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que a presença do PVAT diminuiu a potência da vasoconstrição induzida por PE no grupo controle,

evidenciando o perfil anticontrátil do PVAT comumente observado em condições fisiológicas em diferentes leitos vasculares em roedores e humanos (Soltis and Cassis, 1991; Lohn et al., 2002; Dubrovskaja et al., 2004; Gao et al., 2005b, 2007). Em contrapartida, quando avaliado qual seria o impacto da obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria sobre o perfil vasoativo do PVAT, foi observado que a presença do PVAT aumentou a vasoconstrição induzida por PE no grupo CAF. Quando sobrepomos as curvas concentração-resposta da vasoconstrição induzida por PE nos grupos controle e CAF, é possível visualizar um efeito paradoxo da obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria, em que ao mesmo tempo em que ela leva a diminuição da contratilidade vascular tanto na ausência quanto na presença do PVAT, essa diminuição foi parcialmente compensada na presença do tecido adiposo circundante, sugerindo um perfil vasoconstritor do PVAT na tentativa de restabelecer a contração vascular induzida por PE no grupo CAF.

Nossos achados corroboram com a grande maioria dos estudos encontrados na literatura que demonstram a perda do efeito anticontrátil do PVAT na obesidade induzida por diferentes dietas, culminando em um perfil vasoconstritor do PVAT (Marchesi et al., 2009; Ketonen et al., 2010a; Ma et al., 2010; Owen et al., 2013; Sun et al., 2013; Gil-Ortega et al., 2014; Aghamohammadzadeh et al., 2015; Zaborska et al., 2016; da Costa et al., 2017; Almagrouk et al., 2018). Observações semelhantes também foram feitas em vasos humanos em estudos *in vitro* (Greenstein et al., 2009). No entanto, até o momento nossos achados são os primeiros a abordarem o impacto da dieta do tipo cafeteria sobre o perfil vasoativo do PVAT, especificamente na contratilidade vascular.

Atualmente, somente um trabalho na literatura demonstrou o efeito da dieta de cafeteria sobre o papel do PVAT apenas no relaxamento vascular induzido por ACh em aortas torácicas de camundongos C57BL/6J (Lang et al., 2019). Nesse estudo, os autores encontraram que a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria à longo prazo mostrou ser mais eficaz em causar disfunção do PVAT e consequente disfunção endotelial quando comparado à dieta “*high fat*” após um período de 12 semanas. O prejuízo do relaxamento vascular dependente do endotélio observado foi associado à significativa redução da fosforilação do sítio de ativação da Akt (serina 473) e da eNOS (serina 1177) no PVAT dos animais que receberam dieta “*high fat*” e dieta de cafeteria (Lang et al., 2019). Contudo, ao

contrário dos resultados encontrados por Lang et al. (2019), nossos achados demonstraram que a presença do PVAT não alterou o relaxamento vascular induzido por ACh em ambos os grupos controle e CAF. Podemos atribuir esses diferentes resultados encontrados ao período de dieta utilizado à curto ou à longo prazo. Outros estudos também demonstraram que na obesidade induzida por dieta “*high fat*” ao longo de 20 à 32 semanas, o relaxamento vascular endotélio-dependente foi significativamente prejudicado na presença do PVAT (Ketonen et al., 2010a; Gil-Ortega et al., 2014; Xia et al., 2016).

Assim, apesar do PVAT apresentar um perfil vasoconstritor frente a contração vascular induzida por PE, esse perfil não foi observado frente à vasodilatação induzida por ACh. Poderíamos associar esses diferentes perfis ao fato de que os fatores secretados pelo PVAT podem depender do estímulo vasoconstritor ou vasodilatador aplicado (Gao et al., 2007).

Quando avaliado quais seriam os possíveis mecanismos relacionados ao perfil vasoconstritor do PVAT encontrado na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria, apostamos na hipótese de que a ativação do sistema renina-angiotensina tecidual, presente no PVAT, poderia estar envolvida, uma vez que os componentes essenciais do sistema foram mostrados serem expressos no PVAT (Cassis, 2000; Galvez-Prieto et al., 2008; Nobrega et al., 2019). Além disso, evidências crescentes sugerem que a via de sinalização ECA/Ang II/AT₁ estaria associada à disfunção do PVAT, podendo representar um elo importante para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (Mathai et al., 2011; Sakaue et al., 2017). Ao verificarmos a participação do sistema renina-angiotensina no perfil vasoativo do PVAT no grupo CAF, nossos achados demonstraram que a inibição da ECA e o antagonismo dos receptores AT₁ aboliram o aumento da contração vascular observado na presença do PVAT no grupo CAF, sugerindo a importante contribuição do sistema renina-angiotensina no perfil vasoconstritor do PVAT na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria.

A hiperativação do sistema renina-angiotensina é geralmente acompanhada por níveis plasmáticos elevados de Ang II, considerada o principal peptídeo efetor do sistema (Faria-Costa et al., 2014). Como já abordado anteriormente, a Ang II está entre os fatores vasoconstritores produzidos e secretados pelo PVAT (Galvez-Prieto et al., 2008). Devido aos seus efeitos contráteis, oxidativos e pró-inflamatórios, a

produção local de Ang II pelo PVAT possui impacto substancial na função e estrutura vascular (Cassis et al., 2008; Faria-Costa et al., 2014). No presente estudo, a participação da Ang II no perfil vasoconstritor do PVAT observado no grupo CAF foi verificada apenas de maneira indireta por meio da ativação dos receptores AT₁, responsáveis por desencadear as principais respostas biológicas que contribuem para o efeito vasoconstritor da Ang II (Faria-Costa et al., 2014). Contudo, experimentos adicionais são necessários para investigar se a dieta de cafeteria levaria ao aumento na produção de Ang II circulante e no PVAT.

Estudos anteriores mostraram que a ativação dos receptores AT₁ pela Ang II na vasculatura e no PVAT é associada a um desequilíbrio oxidante/antioxidante no sistema vascular ao induzir o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como o O₂⁻ considerado um potente agente vasoconstritor, por meio da ativação da enzima NADPH oxidase (Lassegue et al., 2001; Cassis et al., 2008; Nguyen Dinh Cat et al., 2013; Ramalingam et al., 2017). Ao verificarmos o envolvimento da NADPH oxidase e O₂⁻ no perfil vasoconstritor do PVAT em aortas do grupo CAF, nossos achados revelaram que a inibição da NADPH oxidase e da produção de O₂⁻ também foi capaz de abolir o aumento da contração vascular observado na presença do PVAT no grupo CAF, sugerindo a importante contribuição das espécies reativas de oxigênio no perfil vasoconstritor do PVAT na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria. Esses resultados corroboraram com os experimentos de fluorescência que mostraram aumento nos níveis de O₂⁻ no PVAT do grupo CAF em comparação ao grupo controle.

Estudos relataram que os adipócitos que compõe o PVAT são fonte importante de O₂⁻ vascular, e a enzima NADPH oxidase, que representa a principal fonte de O₂⁻ na vasculatura, também foi mostrada ser expressa no PVAT (Furukawa et al., 2004; Gao et al., 2006). Além disso, o aumento da atividade de NADPH oxidase e da produção de ânions superóxido foi também demonstrado em um modelo de obesidade induzido por dieta (Ketonen et al., 2010b). Devido à sua alta reatividade, o O₂⁻ proveniente da NADPH oxidase pode reagir com o NO levando a produção de peroxinitrito (ONOO⁻) e consequente diminuição da biodisponibilidade de NO, prejudicando o relaxamento vascular (Channon and Guzik, 2002). O ONOO⁻ é um agente oxidante muito mais potente do que o O₂⁻ e, em altas concentrações, pode levar ao desacoplamento da NOS, também levando a diminuição da

biodisponibilidade de NO (Landmesser et al., 2003). Uma vez que nossos achados demonstraram que a dieta de cafeteria leva ao aumento na produção de NO na aorta torácica dissecada do tecido adiposo circundante e que na presença do PVAT há o aumento na produção de O_2^- , sugerimos que o NO advindo da aorta possa reagir com o O_2^- produzido pelo PVAT levando à produção de $ONOO^-$, contribuindo para o aumento da contração vascular observado na presença do PVAT no grupo CAF. Contudo, experimentos adicionais são necessários para investigar se a dieta de cafeteria levaria ao aumento na produção de $ONOO^-$ na vasculatura.

Conforme já abordado anteriormente, as doenças cardiometabólicas compartilham a fisiopatologia comum da inflamação crônica de baixo grau não resolvida. Nesse contexto, os metabólitos do ácido araquidônico são fatores importantes na iniciação e na resolução da inflamação e têm sido detectado tanto sistemicamente quanto em tecidos específicos, como no PVAT, que adquire um perfil pró-inflamatório, contribuindo para a perda do seu efeito anticonstrítil durante a obesidade (Lumeng et al., 2007; Mendizabal et al., 2013; Nosalski and Guzik, 2017; Sonnweber et al., 2018).

Evidências experimentais demonstraram haver relação entre o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e o aumento da expressão e atividade da COX (Hernanz et al., 2014). Os produtos derivados de COX são considerados moduladores cruciais do tônus vascular e da agregação plaquetária em condições fisiológicas e patológicas (Ozen et al., 2013; Hernanz et al., 2014). Em condições fisiológicas, a maioria dos prostanóides é produzida pela isoforma constitutiva COX_1 , enquanto a COX_2 é induzida por estímulos inflamatórios e outros fatores, como Ang II, e expressa constitutivamente sob condições patológicas em vários órgãos e tipos de células, incluindo a parede vascular (Alvarez et al., 2005; Álvarez et al., 2007; Beltrán et al., 2009; Viridis et al., 2009). Ao avaliarmos a participação da COX no perfil vasoconstritor do PVAT na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria, de forma surpreendente foi encontrado que apenas a inibição da COX_1 foi capaz de abolir o aumento da contração vascular observado na presença do PVAT no grupo CAF, sugerindo que a inflamação crônica de baixo grau desencadeada pela dieta de cafeteria à curto prazo talvez não seria suficiente para induzir a expressão e ativação da COX_2 . Esses resultados corroboraram com os ensaios de

imunofluorescência que mostraram aumento da intensidade de fluorescência apenas da isoforma COX₁ no PVAT do grupo CAF.

O aumento na produção de derivados da COX, como a prostaglandina F₂α (PGF₂α), e o tromboxano A₂ (TxA₂), é geralmente relacionado à vasoconstrição e ao remodelamento da parede vascular, bem como à agregação plaquetária e trombose, estando envolvido em alterações na função e estrutura vascular observadas em doenças cardiovasculares (Ozen et al., 2013; Hernanz et al., 2014). Mendizabal et al. (2013) demonstraram que o PVAT é importante fonte de produtos vasoativos derivados da COX, como prostaglandinas e tromboxano, que influenciam o controle do tônus vascular durante a síndrome metabólica. No presente estudo, a participação dos derivados vasoconstritores da COX, PGF₂α e TxA₂, no perfil vasoconstritor o PVAT observado no grupo CAF foi avaliada de maneira indireta por meio do antagonismo dos seus respectivos receptores. Nossos achados revelaram que a ativação de ambos os receptores de PGF₂α e TxA₂ estariam envolvidos no aumento da contração vascular observado na presença do PVAT no grupo CAF, sugerindo a importante contribuição desses produtos derivados da COX para o perfil vasoconstritor do PVAT na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria.

Em conjunto, a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria alterou o perfil vasoativo do PVAT, que passou a apresentar um efeito vasoconstritor quando estimulado com PE, envolvendo a ativação do sistema renina-angiotensina por meio da ativação de ECA e dos receptores AT₁. Verificou-se também o aumento na produção de O₂⁻, ativação da COX₁ e dos receptores para PGF₂α e TxA₂. O perfil vasoconstritor do PVAT poderia refletir a tentativa de restabelecer a contração vascular induzida por PE, significativamente diminuída na ausência do tecido adiposo circundante.

Por fim, ao avaliarmos se as principais alterações cardiometabólicas encontradas após a administração da dieta de cafeteria por 4 semanas seriam reversíveis ou não, os animais do grupo CAF foram alimentados com dieta de cafeteria por 4 semanas consecutivas e, posteriormente, alimentados com dieta padrão para roedores por mais 4 semanas. Nossos achados revelaram que o tratamento dietético foi capaz de reverter as principais alterações metabólicas e cardiovasculares anteriormente observadas, incluindo a redução do peso corporal e

do índice de adiposidade e o reestabelecimento dos parâmetros avaliados na função cardíaca, bem como o reestabelecimento da contratilidade vascular na ausência e na presença do PVAT. Assim, nossos resultados são indicativos que as alterações observadas na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria à curto prazo são ainda iniciais, possivelmente adaptativas, e passíveis de mudança com a modificação da dieta, sem a necessidade de intervenções farmacológicas.

Bussey et al. (2016) demonstraram que o prejuízo cardiometabólico encontrado na obesidade induzida por dieta pode ser melhorado com a perda de peso por meio de um mecanismo que envolve redução da inflamação no tecido adiposo e aumento da atividade da NOS e biodisponibilidade de NO. Apesar de os mecanismos envolvidos na reversão dos parâmetros avaliados no presente estudo não terem sido explorados, sugerimos que a significativa redução do índice de adiposidade possa diminuir o perfil inflamatório e oxidativo sistêmico e local estimulado pela expansão, hipertrofia e hipóxia dos adipócitos na obesidade que resultam em inflamação crônica de baixo grau e anormalidades na função dos adipócitos (Nakamura et al., 2014; Koliaki et al., 2018).

6 Conclusão

A dieta de cafeteria representa um modelo de obesidade e síndrome metabólica induzida por dieta que possibilita investigar as alterações cardiovasculares associadas a distúrbios metabólicos em um curto período de tempo. No presente estudo, a obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria por apenas 4 semanas demonstrou pré-dispor arritmias e alterações na função cardíaca que, à longo prazo, poderiam evoluir para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Além disso, foi também observado um perfil hiporresponsivo da aorta torácica dissecada do tecido adiposo circundante frente ao estímulo vasoconstritor induzido por PE, o qual poderia ser atribuído ao aumento nos níveis séricos leptina e na produção de NO e H₂O₂ pelas células endoteliais. Em contrapartida, a hiporresponsividade aórtica foi parcialmente restabelecida pelo perfil vasoconstritor do PVAT, envolvendo a ativação da ECA e dos receptores AT₁, estresse oxidativo e ativação dos receptores para PGF₂α e TxA₂. Assim, sugerimos que as alterações cardíacas e vasculares encontradas na obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria, à curto prazo, constituem características adaptativas compensatórias na tentativa de preservar o sistema cardiovascular, as quais são ainda passíveis de reversão quando realizado o tratamento dietético.

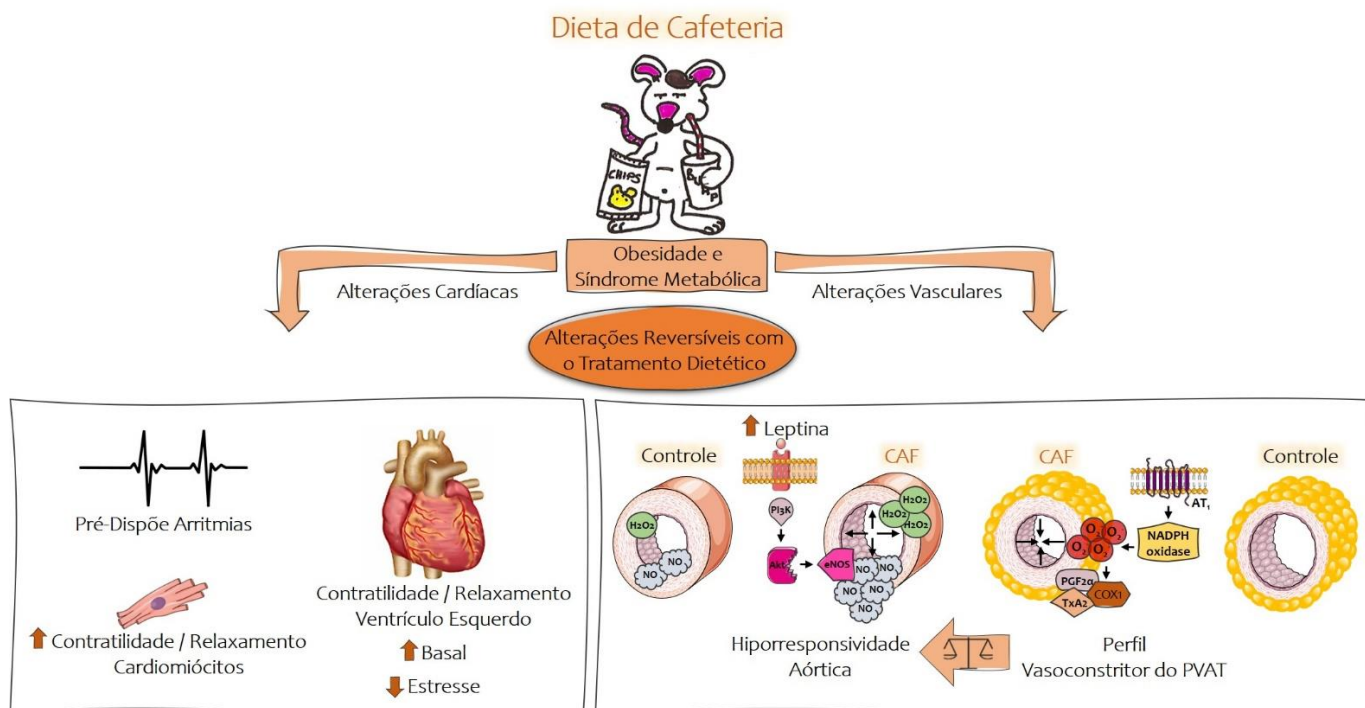


Figura 55 - Mecanismos propostos envolvidos nas alterações cardiometabólicas induzidas pela obesidade desencadeada pela dieta de cafeteria.

Referências

- Agabiti-Rosei, C., Paini, A., De Ciuceis, C., Withers, S., Greenstein, A., Heagerty, A. M., et al. (2018). Modulation of Vascular Reactivity by Perivascular Adipose Tissue (PVAT). *Curr. Hypertens. Rep.* 20. doi:10.1007/s11906-018-0835-5.
- Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R. D., Greenstein, A. S., and Heagerty, A. M. (2015). Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J Vasc Res* 52, 299–305. doi:10.1159/000443885.
- Alam, M. A., Kauter, K., and Brown, L. (2013). Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. *Nutrients* 5. doi:10.3390/nu5030637.
- Almabrouk, T. A. M., White, A. D., Ugusman, A. B., Skiba, D. S., Katwan, O. J., Alganga, H., et al. (2018). High fat diet attenuates the anticontractile activity of aortic PVAT via a mechanism involving AMPK and reduced adiponectin secretion. *Front. Physiol.* 9. doi:10.3389/fphys.2018.00051.
- Alvarez, Y., Briones, A. M., Balfagón, G., Alonso, M. J., and Salaices, M. (2005). Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J. Hypertens.* 23. doi:10.1097/01.hjh.0000163145.12707.63.
- Álvarez, Y., Pérez-Girón, J. V., Hernanz, R., Briones, A. M., García-Redondo, A., Beltrán, A., et al. (2007). Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321. doi:10.1124/jpet.106.115287.
- Apovian, C. M. (2016). Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am. J. Manag. Care* 22.
- Azevedo, F. R., and Brito, B. C. (2012). Influence of nutritional variables and obesity on health and metabolism. *Rev Assoc Med Bras* 58, 714–723. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23250102>.
- Barbosa, A. S., and Lin, C. J. (2004). Gene silencing with RNA interference: a novel tool for the study of physiology and pathophysiology of adrenal cortex. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48. doi:10.1590/s0004-27302004000500005.

- Barrett, P., Mercer, J. G., and Morgan, P. J. (2016). Preclinical models for obesity research. *DMM Dis. Model. Mech.* doi:10.1242/dmm.026443.
- Bell, B. B., and Rahmouni, K. (2016). Leptin as a Mediator of Obesity-Induced Hypertension. *Curr. Obes. Rep.* 5. doi:10.1007/s13679-016-0231-x.
- Beltowski, J. (2012). Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39, 168–178. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05623.x.
- Beltrán, A. E., Briones, A. M., García-Redondo, A. B., Rodríguez, C., Miguel, M., Álvarez, Y., et al. (2009). P38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.* 27. doi:10.1097/HJH.0b013e328317a730.
- Bhupathiraju, S. N., and Hu, F. B. (2016). Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications. *Circ. Res.* doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306825.
- Bjørnbæk, C., Uotani, S., Da Silva, B., and Flier, J. S. (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272. doi:10.1074/jbc.272.51.32686.
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* doi:10.1038/s41574-019-0176-8.
- Bortolin, R. C., Vargas, A. R., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., Martinello, K. B., et al. (2018). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: Comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int. J. Obes.* doi:10.1038/ijo.2017.225.
- Bouloumié, A., Marumo, T., Lafontan, M., and Busse, R. (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.* 13. doi:10.1096/fasebj.13.10.1231.
- Bray, G. A., Kim, K. K., and Wilding, J. P. H. (2017). Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes. Rev.* 18. doi:10.1111/obr.12551.

- Britton, K. A., and Fox, C. S. (2011). Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation* 124. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.077602.
- Brown, N. K., Zhou, Z., Zhang, J., Zeng, R., Wu, J., Eitzman, D. T., et al. (2014). Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: A review of current research and animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* doi:10.1161/ATVBAHA.114.303029.
- Buettner, R., Scholmerich, J., and Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obes. (Silver Spring)* 15, 798–808. doi:10.1038/oby.2007.608.
- Bussey, C. E., Withers, S. B., Aldous, R. G., Edwards, G., and Heagerty, A. M. (2016). Obesity-Related Perivascular Adipose Tissue Damage Is Reversed by Sustained Weight Loss in the Rat. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307210.
- Caballero, B. (2019). Humans against Obesity: Who Will Win? in *Advances in Nutrition* doi:10.1093/advances/nmy055.
- Cameron-Smith, D., Burke, L. M., Angus, D. J., Tunstall, R. J., Cox, G. R., Bonen, A., et al. (2003). A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am J Clin Nutr* 77, 313–318. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540388>.
- Campfield, L. A., Smith, F. J., and Burn, P. (1996). The OB Protein (Leptin) Pathway - A Link between Adipose Tissue Mass and Central Neural Networks. *Horm. Metab. Res.* 28. doi:10.1055/s-2007-979867.
- Carbone, S., Lavie, C. J., and Arena, R. (2018). The Obesity Paradigm and Lifetime Risk of Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiol* 3, 894–895. doi:10.1001/jamacardio.2018.1834.
- Cassis, L. A. (2000). Fat cell metabolism: Insulin, fatty acids, and renin. *Curr. Hypertens. Rep.* doi:10.1007/s11906-000-0072-5.
- Cassis, L. A., Police, S. B., Yiannikouris, F., and Thatcher, S. E. (2008). Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep* 10, 93–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18474174>.

- Channon, K. M., and Guzik, T. J. (2002). Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: Relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. in *Journal of Physiology and Pharmacology*.
- Chatterjee, T. K., Stoll, L. L., Denning, G. M., Harrelson, A., Blomkalns, A. L., Idelman, G., et al. (2009). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res* 104, 541–549. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182998.
- Costa, R. M., Neves, K. B., Tostes, R. C., and Lobato, N. S. (2018). Perivascular adipose tissue as a relevant fat depot for cardiovascular risk in obesity. *Front. Physiol.* 9. doi:10.3389/fphys.2018.00253.
- Csige, I., Ujvárosy, D., Szabó, Z., Lorincz, I., Paragh, G., Harangi, M., et al. (2018). The Impact of Obesity on the Cardiovascular System. *J. Diabetes Res.* doi:10.1155/2018/3407306.
- da Costa, R. M., Fais, R. S., Dechandt, C. R. P., Louzada-Junior, P., Alberici, L. C., Lobato, N. S., et al. (2017). Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular adipose tissue in high-fat diet obese mice. *Br. J. Pharmacol.* 174. doi:10.1111/bph.13687.
- Da Costa, R. M., Rodrigues, D., Pereira, C. A., Silva, J. F., Alves, J. V., Lobato, N. S., et al. (2019). Nrf2 as a potential mediator of cardiovascular risk in metabolic diseases. *Front. Pharmacol.* doi:10.3389/fphar.2019.00382.
- Dashwood, M. R., Dooley, A., Shi-Wen, X., Abraham, D. J., Dreifaldt, M., and Souza, D. S. R. (2011). Perivascular fat-derived leptin: A potential role in improved vein graft performance in coronary artery bypass surgery. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* doi:10.1510/icvts.2010.247874.
- Dubrovská, G., Verlohren, S., Luft, F. C., and Gollasch, M. (2004). Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. *Am J Physiol Heart. Circ Physiol* 286, H1107-13. doi:10.1152/ajpheart.00656.2003.
- Eckel, R. H., and Krauss, R. M. (1998). American Heart Association call to action: Obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *Circulation* 97. doi:10.1161/01.CIR.97.21.2099.
- Edwards, G., Félétou, M., and Weston, A. H. (2010). Endothelium-derived

- hyperpolarising factors and associated pathways: A synopsis. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 459. doi:10.1007/s00424-010-0817-1.
- Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P., and Cowley, M. A. (2006). Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 14 Suppl 5. doi:10.1038/oby.2006.319.
- Fang, L., Zhao, J., Chen, Y., Ma, T., Xu, G., Tang, C., et al. (2009). Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *J. Hypertens.* 27. doi:10.1097/HJH.0b013e328330a900.
- Faria-Costa, G., Leite-Moreira, A., and Henriques-Coelho, T. (2014). Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor. *Rev Port Cardiol* 33, 439–449. doi:10.1016/j.repc.2014.02.011.
- Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S., and Hirsch, J. (1978). Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: A new model of obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. Gastrointest. Physiol.* 4. doi:10.1152/ajpendo.1978.235.3.e279.
- Fedorenko, A., Lishko, P. V, and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* 151, 400–413. doi:10.1016/j.cell.2012.09.010.
- FENTON, P. F., and DOWLING, M. T. (1953). Studies on obesity. I. Nutritional obesity in mice. *J. Nutr.* 49. doi:10.1093/jn/49.2.319.
- Fernández-Alfonso, M. S., Gil-Ortega, M., García-Prieto, C. F., Arangué, I., Ruiz-Gayo, M., and Somoza, B. (2013). Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. *Int. J. Endocrinol.* 2013. doi:10.1155/2013/402053.
- Ferreira, A. V, Mario, E. G., Porto, L. C., Andrade, S. P., and Botion, L. M. (2011). High-carbohydrate diet selectively induces tumor necrosis factor-alpha production in mice liver. *Inflammation* 34, 139–145. doi:10.1007/s10753-010-9217-0.
- Fesus, G., Dubrovskaja, G., Gorzelniak, K., Kluge, R., Huang, Y., Luft, F. C., et al. (2007). Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res* 75, 719–727. doi:10.1016/j.cardiores.2007.05.025.
- Finkelstein, E. A., Khavjou, O. A., Thompson, H., Trogon, J. G., Pan, L., Sherry, B.,

- et al. (2012). Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *Am. J. Prev. Med.* doi:10.1016/j.amepre.2011.10.026.
- Flanagan, A. M., Brown, J. L., Santiago, C. A., Aad, P. Y., Spicer, L. J., and Spicer, M. T. (2008). High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. *J Nutr Biochem* 19, 505–513. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.06.005.
- Förstermann, U., and Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* 33. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- Frontini, A., and Cinti, S. (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab* 11, 253–256. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004.
- Fulop, T., Jebelovszki, E., Erdei, N., Szerafin, T., Forster, T., Edes, I., et al. (2007). Adaptation of vasomotor function of human coronary arterioles to the simultaneous presence of obesity and hypertension. *Arter. Thromb Vasc Biol* 27, 2348–2354. doi:10.1161/ATVBAHA.107.147991.
- Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831>.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., et al. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114. doi:10.1172/JCI21625.
- Galvez-Prieto, B., Bolbrinker, J., Stucchi, P., de Las Heras, A. I., Merino, B., Arribas, S., et al. (2008). Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol* 197, 55–64. doi:10.1677/JOE-07-0284.
- Gálvez-Prieto, B., Somoza, B., Gil-Ortega, M., García-Prieto, C. F., de las Heras, A. I., González, M. C., et al. (2012). Anticontractile effect of perivascular adipose tissue and leptin are reduced in hypertension. *Front. Pharmacol.* doi:10.3389/fphar.2012.00103.
- Gao, Y. J. (2007). Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular

- dysfunction. *Curr Pharm Des* 13, 2185–2192. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627551>.
- Gao, Y. J., Holloway, A. C., Zeng, Z. H., Lim, G. E., Petrik, J. J., Foster, W. G., et al. (2005a). Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obes Res* 13, 687–692. doi:10.1038/oby.2005.77.
- Gao, Y. J., Lu, C., Su, L. Y., Sharma, A. M., and Lee, R. M. K. W. (2007). Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: The role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br. J. Pharmacol.* doi:10.1038/sj.bjp.0707228.
- Gao, Y. J., Takemori, K., Su, L. Y., An, W. S., Lu, C., Sharma, A. M., et al. (2006). Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. *Cardiovasc Res* 71, 363–373. doi:10.1016/j.cardiores.2006.03.013.
- Gao, Y. J., Zeng, Z. H., Teoh, K., Sharma, A. M., Abouzahr, L., Cybulsky, I., et al. (2005b). Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* doi:10.1016/j.jtcvs.2005.05.028.
- Ghantous, C. M., Azrak, Z., Hanache, S., Abou-Kheir, W., and Zeidan, A. (2015). Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *Int. J. Endocrinol.* 2015. doi:10.1155/2015/534320.
- Gil-Ortega, M., Condezo-Hoyos, L., Garcia-Prieto, C. F., Arribas, S. M., Gonzalez, M. C., Aranguiz, I., et al. (2014). Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One* 9, e95312. doi:10.1371/journal.pone.0095312.
- Gil-Ortega, M., Somoza, B., Huang, Y., Gollasch, M., and Fernandez-Alfonso, M. S. (2015). Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 26, 367–375. doi:10.1016/j.tem.2015.04.003.
- Gollasch, M., and Dubrovskaja, G. (2004). Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. *Trends Pharmacol Sci* 25, 647–653. doi:10.1016/j.tips.2004.10.005.

- González-Muniesa, P., Martínez-González, M. A., Hu, F. B., Després, J. P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., et al. (2017). Obesity. *Nat. Rev. Dis. Prim.* doi:10.1038/nrdp.2017.34.
- Greenstein, A. S., Khavandi, K., Withers, S. B., Sonoyama, K., Clancy, O., Jeziorska, M., et al. (2009). Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation* 119, 1661–1670. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181.
- Gregersen, S., Samocha-Bonet, D., Heilbronn, L. K., and Campbell, L. V (2012). Inflammatory and oxidative stress responses to high-carbohydrate and high-fat meals in healthy humans. *J Nutr Metab* 2012, 238056. doi:10.1155/2012/238056.
- Grigoras, A., Amalinei, C., Balan, R. A., Giusca, S. E., and Caruntu, I. D. (2019). Perivascular adipose tissue in cardiovascular diseases-an update. *Anatol. J. Cardiol.* 22. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2019.91380.
- Grundey, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., and Lenfant, C. (2004). Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. in *Circulation* doi:10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6.
- Guatimosim, S., Dilly, K., Ferno Santana, L., Saleet Jafri, M., Sobie, E. A., and Lederer, W. J. (2002). Local Ca²⁺ signaling and EC coupling in heart: Ca²⁺ sparks and the regulation of the [Ca²⁺]_i transient. *J. Mol. Cell. Cardiol.* doi:10.1006/jmcc.2002.2032.
- Guyton, A. C., and Hall, J. E. (2011). *Guyton & Hall: Tratado de Fisiologia médica.*
- Hammarstedt, A., Gogg, S., Hedjazifar, S., Nerstedt, A., and Smith, U. (2018). Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity. *Physiol. Rev.* 98. doi:10.1152/physrev.00034.2017.
- Hanft, L. M., Emter, C. A., and McDonald, K. S. (2017). Cardiac myofibrillar contractile properties during the progression from hypertension to decompensated heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 313. doi:10.1152/ajpheart.00069.2017.
- Hare, J. M., and Stamler, J. S. (2005). NO/redox disequilibrium in the failing heart

- and cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* 115. doi:10.1172/JCI200524459.
- Hernanz, R., Briones, A. M., Salaices, M., and Alonso, M. J. (2014). New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase in hypertension. *Clin. Sci.* 126. doi:10.1042/CS20120651.
- Hruby, A., and Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 33. doi:10.1007/s40273-014-0243-x.
- Huang Cao, Z. F., Stoffel, E., and Cohen, P. (2017). Role of Perivascular Adipose Tissue in Vascular Physiology and Pathology. *Hypertension* 69. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08451.
- James A., R. (2019). Intra-Atrial Block: Definition and Relationship to Atrial Fibrillation and Other Adverse Outcomes. *J. Atr. Fibrillation* 12. doi:10.4022/jafib.2234.
- Joffin, N., Niang, F., Forest, C., and Jaubert, A. M. (2012). Is there NO help for leptin? *Biochimie* 94. doi:10.1016/j.biochi.2012.06.017.
- Kaakinen, M., Reichelt, M. E., Ma, Z., Ferguson, C., Martel, N., Porrello, E. R., et al. (2017). Cavin-1 deficiency modifies myocardial and coronary function, stretch responses and ischaemic tolerance: roles of NOS over-activity. *Basic Res. Cardiol.* 112. doi:10.1007/s00395-017-0613-6.
- Kang, K. W., Ok, M., and Lee, S. K. (2020). Leptin as a key between obesity and cardiovascular disease. *J. Obes. Metab. Syndr.* 29. doi:10.7570/JOMES20120.
- Kelly, T., Yang, W., Chen, C. S., Reynolds, K., and He, J. (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int. J. Obes.* doi:10.1038/ijo.2008.102.
- Kershaw, E. E., and Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. in *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* doi:10.1210/jc.2004-0395.
- Ketonen, J., Shi, J., Martonen, E., and Mervaala, E. (2010a). Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J* 74, 1479–1487. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20526041>.
- Ketonen, J., Shi, J., Martonen, E., and Mervaala, E. (2010b). Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57BL/6 mice. *Circ. J.* doi:10.1253/circj.CJ-09-0661.

- Koliaki, C., Liatis, S., and Kokkinos, A. (2018). Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism*. doi:10.1016/j.metabol.2018.10.011.
- Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., and Michel, J. B. (2012). The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* 95. doi:10.1093/cvr/cvs135.
- Landecheo, M. F., Tuero, C., Valentí, V., Bilbao, I., de la Higuera, M., and Frühbeck, G. (2019). Relevance of leptin and other adipokines in obesity-associated cardiovascular risk. *Nutrients* 11. doi:10.3390/nu11112664.
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., et al. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* doi:10.1172/JCI200314172.
- Lang, P., Hasselwander, S., Li, H., and Xia, N. (2019). Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Sci. Rep.* 9. doi:10.1038/s41598-019-55987-x.
- Lassegue, B., Sorescu, D., Szocs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., et al. (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88, 888–894. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11348997>.
- Lavie, C. J., Milani, R. V., and Ventura, H. O. (2009). Obesity and Cardiovascular Disease. Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *J. Am. Coll. Cardiol.* 53. doi:10.1016/j.jacc.2008.12.068.
- Lee, R. M., Lu, C., Su, L. Y., and Gao, Y. J. (2009). Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J Hypertens* 27, 782–790. doi:10.1097/HJH.0b013e328324ed86.
- Lee, Y. S., Li, P., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Lu, M., Kim, J. I., et al. (2011). Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 60, 2474–2483. doi:10.2337/db11-0194.
- Lohn, M., Dubrovskaja, G., Lauterbach, B., Luft, F. C., Gollasch, M., and Sharma, A. M. (2002). Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J* 16, 1057–1063. doi:10.1096/fj.02-0024com.

- Lumeng, C. N., Deyoung, S. M., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16–23. doi:10.2337/db06-1076.
- Ma, L., Ma, S., He, H., Yang, D., Chen, X., Luo, Z., et al. (2010). Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Hypertens Res* 33, 446–453. doi:10.1038/hr.2010.11.
- Maenhaut, N., and Van de Voorde, J. (2011). Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med.* 9. doi:10.1186/1741-7015-9-25.
- Majesky, M. W. (2015). Adventitia and perivascular cells. *Arter. Thromb Vasc Biol* 35, e31-5. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306088.
- Malinowski, M., Deja, M. A., Gołba, K. S., Roleder, T., Biernat, J., and Woś, S. (2008). Perivascular tissue of internal thoracic artery releases potent nitric oxide and prostacyclin-independent anticontractile factor. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* doi:10.1016/j.ejcts.2007.11.007.
- Mandviwala, T., Khalid, U., and Deswal, A. (2016). Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker? *Curr Atheroscler Rep* 18, 21. doi:10.1007/s11883-016-0575-4.
- Marchesi, C., Ebrahimian, T., Angulo, O., Paradis, P., and Schiffrin, E. L. (2009). Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension* 54, 1384–1392. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138305.
- Mark, A. L., Correia, M. L. G., Rahmouni, K., and Haynes, W. G. (2002). Selective leptin resistance: A new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. *J. Hypertens.* 20. doi:10.1097/00004872-200207000-00001.
- Mathai, M. L., Chen, N., Cornall, L., and Weisinger, R. S. (2011). The role of angiotensin in obesity and metabolic disease. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 11, 198–205. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831033>.
- Matoba, T., and Shimokawa, H. (2003). Hydrogen peroxide is an endothelium-

- derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J. Pharmacol. Sci.* 92. doi:10.1254/jphs.92.1.
- Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., et al. (2000). Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106, 1521–1530. doi:10.1172/JCI10506.
- Mattu, H. S., and Randeva, H. S. (2013). Role of adipokines in cardiovascular disease. *J. Endocrinol.* 216. doi:10.1530/JOE-12-0232.
- Meddings, J. B., Scott, R. B., and Fick, G. H. (1989). Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data. *Am J Physiol* 257, G982-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2610264>.
- Mendizabal, Y., Llorens, S., and Nava, E. (2013). Vasoactive effects of prostaglandins from the perivascular fat of mesenteric resistance arteries in WKY and SHROB rats. *Life Sci* 93, 1023–1032. doi:10.1016/j.lfs.2013.10.021.
- Miao, C. Y., and Li, Z. Y. (2012). The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol* 165, 643–658. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01404.x.
- Moore, B. J. (1987). The cafeteria diet--an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *J. Nutr.* 117. doi:10.1093/jn/117.2.227.
- Mraz, M., and Haluzik, M. (2014). The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J. Endocrinol.* 222. doi:10.1530/JOE-14-0283.
- Nakamura, K., Fuster, J. J., and Walsh, K. (2014). Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol* 63, 250–259. doi:10.1016/j.jjcc.2013.11.006.
- Nguyen Dinh Cat, A., Montezano, A. C., Burger, D., and Touyz, R. M. (2013). Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxidants Redox Signal.* 19. doi:10.1089/ars.2012.4641.
- Nobrega, N., Araujo, N. F., Reis, D., Facine, L. M., Miranda, C. A. S., Mota, G. C., et al. (2019). Hydrogen peroxide and nitric oxide induce anticontractile effect of perivascular adipose tissue via renin angiotensin system activation. *Nitric Oxide* 84, 50–59. doi:10.1016/j.niox.2018.12.011.

- Nosalski, R., and Guzik, T. J. (2017). Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br. J. Pharmacol.* 174. doi:10.1111/bph.13705.
- Oikonomou, E. K., and Antoniades, C. (2019). The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 16. doi:10.1038/s41569-018-0097-6.
- Oldroyd, S. H., and Makaryus, A. N. (2019). First Degree Heart Block. *StatPearls*.
- Oliveira, M. C., Menezes-Garcia, Z., Henriques, M. C., Soriani, F. M., Pinho, V., Faria, A. M., et al. (2013). Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obes. (Silver Spring)* 21, E396-406. doi:10.1002/oby.20230.
- Oliveira, M. C., Silveira, A. L., Tavares, L. P., Rodrigues, D. F., van de Loo, F. A., Sousa, L. P., et al. (2017). Two opposite extremes of adiposity similarly reduce inflammatory response of antigen-induced acute joint inflammation. *Nutrition* 33, 132–140. doi:10.1016/j.nut.2016.05.008.
- Oliveira, V. B., Ferreira, A. V. M., Oliveira, M. C., Teixeira, M. M., and Brandão, M. G. L. (2014). Effects of *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. fruit on metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing-diet in mice. *Food Res. Int.* 62. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.066.
- Ortega, F. B., Lavie, C. J., and Blair, S. N. (2016). Obesity and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 118, 1752–1770. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306883.
- Owen, M. K., Witzmann, F. A., McKenney, M. L., Lai, X., Berwick, Z. C., Moberly, S. P., et al. (2013). Perivascular adipose tissue potentiates contraction of coronary vascular smooth muscle: influence of obesity. *Circulation* 128, 9–18. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001238.
- Ozen, G., Topal, G., Gomez, I., Ghorreshi, A., Boukais, K., Benyahia, C., et al. (2013). Control of human vascular tone by prostanoids derived from perivascular adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 107, 13–17. doi:10.1016/j.prostaglandins.2013.06.002.
- Padilla, J., Jenkins, N. T., Vieira-Potter, V. J., and Harold Laughlin, M. (2013). Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304.

doi:10.1152/ajpregu.00567.2012.

- Panchal, S. K., Poudyal, H., Iyer, A., Nazer, R., Alam, A., Diwan, V., et al. (2011). High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57. doi:10.1097/FJC.0b013e3181feb90a.
- Papadatos, G. A., Wallerstein, P. M. R., Head, C. E. G., Ratcliff, R., Brady, P. A., Benndorf, K., et al. (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99. doi:10.1073/pnas.082121299.
- Peavy, W. C. (2009). Cardiovascular Effects of Obesity: Implications for Critical Care. *Crit. Care Nurs. Clin. North Am.* doi:10.1016/j.ccell.2009.07.005.
- Piche, M. E., Poirier, P., Lemieux, I., and Despres, J. P. (2018). Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. *Prog Cardiovasc Dis* 61, 103–113. doi:10.1016/j.pcad.2018.06.004.
- Pinheiro-Castro, N., Silva, L. B. A. R., Novaes, G. M., and Ong, T. P. (2019). “Hypercaloric diet-induced obesity and obesity-related metabolic disorders in experimental models,” in *Advances in Experimental Medicine and Biology* doi:10.1007/978-3-030-12668-1_8.
- Poirier, P., Giles, T. D., Bray, G. A., Hong, Y., Stern, J. S., Pi-Sunyer, F. X., et al. (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical. *Circulation* 113, 898–918. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.171016.
- Puhl, R. M., and Heuer, C. A. (2010). Obesity stigma: Important considerations for public health. *Am. J. Public Health* 100. doi:10.2105/AJPH.2009.159491.
- Rahmouni, K., Correia, M. L., Haynes, W. G., and Mark, A. L. (2005). Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension* 45, 9–14. doi:10.1161/01.HYP.0000151325.83008.b4.
- Rahmouni, K., and Haynes, W. G. (2004). Leptin and the cardiovascular system.

- Recent Prog. Horm. Res.* 59. doi:10.1210/rp.59.1.225.
- Rahmouni, K., Haynes, W. G., and Mark, A. L. (2002). Cardiovascular and sympathetic effects of leptin. *Curr. Hypertens. Rep.* 4. doi:10.1007/s11906-002-0036-z.
- Ramalingam, L., Menikdiwela, K., LeMieux, M., Dufour, J. M., Kaur, G., Kalupahana, N., et al. (2017). The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863. doi:10.1016/j.bbadis.2016.07.019.
- Reis Costa, D. E. F. dos, Silveira, A. L. M., Campos, G. P., Nóbrega, N. R. C., de Araújo, N. F., de Figueiredo Borges, L., et al. (2021). High-Carbohydrate Diet Enhanced the Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue Through Activation of Renin-Angiotensin System. *Front. Physiol.* 11. doi:10.3389/fphys.2020.628101.
- Roberto, C. A., Swinburn, B., Hawkes, C., Huang, T. T. K., Costa, S. A., Ashe, M., et al. (2015). Patchy progress on obesity prevention: Emerging examples, entrenched barriers, and new thinking. *Lancet.* doi:10.1016/S0140-6736(14)61744-X.
- Rodríguez, A., Fortuño, A., Gómez-Ambrosi, J., Zalba, G., Díez, J., and Frühbeck, G. (2007). The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinology* 148. doi:10.1210/en.2006-0940.
- Rothwell, N. J., Saville, M. E., and Stock, M. J. (1982). Effects of feeding a “cafeteria” diet on energy balance and diet induced thermogenesis in four strains of rat. *J. Nutr.* doi:10.1093/jn/112.8.1515.
- Rubanyi, G. M. (1991). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J. Cell. Biochem.* 46. doi:10.1002/jcb.240460106.
- Safar, M. E., Czernichow, S., and Blacher, J. (2006). Obesity, arterial stiffness, and cardiovascular risk. in *Journal of the American Society of Nephrology* doi:10.1681/ASN.2005121321.
- Sakaue, T., Suzuki, J., Hamaguchi, M., Suehiro, C., Tanino, A., Nagao, T., et al. (2017). Perivascular adipose tissue angiotensin II type 1 receptor promotes

- vascular inflammation and aneurysm formation. *Hypertension* 70. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09512.
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., et al. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obes. (Silver Spring)* 19, 1109–1117. doi:10.1038/oby.2011.18.
- SEVERS, N. J. (1994). Pathophysiology of Gap Junctions in Heart Disease. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 5. doi:10.1111/j.1540-8167.1994.tb01185.x.
- Shafat, A., Murray, B., and Rumsey, D. (2009). Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 52, 34–38. doi:10.1016/j.appet.2008.07.004.
- Shepard, T. Y., Weil, K. M., Sharp, T. A., Grunwald, G. K., Bell, M. L., Hill, J. O., et al. (2001). Occasional physical inactivity combined with a high-fat diet may be important in the development and maintenance of obesity in human subjects. *Am J Clin Nutr* 73, 703–708. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273843>.
- Shimokawa, H., and Matoba, T. (2004). Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pharmacol. Res.* 49. doi:10.1016/j.phrs.2003.10.016.
- Simonds, S. E., Cowley, M. A., and Enriori, P. J. (2012). Leptin increasing sympathetic nerve outflow in obesity. *Adipocyte* 1. doi:10.4161/adip.20690.
- Simonds, S. E., Pryor, J. T., Ravussin, E., Greenway, F. L., Dileone, R., Allen, A. M., et al. (2014). Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell* 159. doi:10.1016/j.cell.2014.10.058.
- Soltis, E. E., and Cassis, L. A. (1991). Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A* 13, 277–296. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2065467>.
- Sonnweber, T., Pizzini, A., Nairz, M., Weiss, G., and Tancevski, I. (2018). Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* 19. doi:10.3390/ijms19113285.

- Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M. M., Ristow, M., et al. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: Results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Diabetes* 52. doi:10.2337/diabetes.52.3.812.
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., et al. (2013). The adventitia: Essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* 75. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183802.
- Stern, J. H., Rutkowski, J. M., and Scherer, P. E. (2016). Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* 23. doi:10.1016/j.cmet.2016.04.011.
- Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., DeFuria, J., Jick, Z., et al. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56. doi:10.2337/db07-0767.
- Sun, K., Kusminski, C. M., Scherer, P. E., Sun, K., Kusminski, C. M., and Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity Find the latest version: Review series Adipose tissue remodeling and obesity. 121, 2094–2101. doi:10.1172/JCI45887.2094.
- Sun, X., Hou, N., Han, F., Guo, Y., Hui, Z., Du, G., et al. (2013). Effect of high free fatty acids on the anti-contractile response of perivascular adipose tissue in rat aorta. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 63. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.07.018.
- Szasz, T., Bomfim, G. F., and Webb, R. C. (2013). The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Heal. Risk Manag* 9, 105–116. doi:10.2147/VHRM.S33760.
- Szasz, T., and Webb, R. C. (2012). Perivascular adipose tissue: More than just structural support. *Clin. Sci.* 122. doi:10.1042/CS20110151.
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83. doi:10.1016/0092-8674(95)90151-5.
- Tilg, H., and Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose

- tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772–783. doi:10.1038/nri1937.
- Veloso, C. C., Oliveira, M. C., Rodrigues, V. G., Oliveira, C. C., Duarte, L. P., Teixeira, M. M., et al. (2019). Evaluation of the effects of extracts of *Maytenus imbricata* (Celastraceae) on the treatment of inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. *Inflammopharmacology* 27. doi:10.1007/s10787-018-0496-7.
- Verlohren, S., Dubrovskaja, G., Tsang, S. Y., Essin, K., Luft, F. C., Huang, Y., et al. (2004). Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 44, 271–276. doi:10.1161/01.HYP.0000140058.28994.ec.
- Vignon-Zellweger, N., Heiden, S., Miyauchi, T., and Emoto, N. (2012). Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. in *Life Sciences* doi:10.1016/j.lfs.2012.03.026.
- Virdis, A., Colucci, R., Versari, D., Ghisu, N., Fornai, M., Antonioli, L., et al. (2009). Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension* 53. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.132258.
- Wang, M. Y., Koyama, K., Shimabukuro, M., Newgard, C. B., and Unger, R. H. (1998). OB-Rb gene transfer to leptin-resistant islets reverses diabetogenic phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95. doi:10.1073/pnas.95.2.714.
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., et al. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116, 115–124. doi:10.1172/JCI24335.
- World Health Organization (2018). WHO - The top 10 causes of death. *24 Maggio*.
- World Health Organization - WHO (2016). Obesity and overweight. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Xia, N., Horke, S., Habermeier, A., Closs, E. I., Reifensberg, G., Gericke, A., et al. (2016). Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arter. Thromb Vasc Biol* 36, 78–85. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306263.

- Xia, N., and Li, H. (2017). The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. *Br. J. Pharmacol.* 174. doi:10.1111/bph.13650.
- Yu, W. H., Walczewska, A., Karanth, S., and McCann, S. M. (1997). Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 138. doi:10.1210/endo.138.11.5649.
- Zaborska, K. E., Wareing, M., Edwards, G., and Austin, C. (2016). Loss of anti-contractile effect of perivascular adipose tissue in offspring of obese rats. *Int. J. Obes.* 40. doi:10.1038/ijo.2016.62.
- Zeeni, N., Dagher-Hamalian, C., Dimassi, H., and Faour, W. H. (2015). Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res* 64, 501–512. doi:10.1007/s00011-015-0831-z.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372. doi:10.1038/372425a0.
- Zhao, S., Kusminski, C. M., and Scherer, P. E. (2021). Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. *Circ. Res.* 128. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.314458.
- Zicker, M. C., Silveira, A. L. M., Lacerda, D. R., Rodrigues, D. F., Oliveira, C. T., de Souza Cordeiro, L. M., et al. (2019). Virgin coconut oil is effective to treat metabolic and inflammatory dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *J. Nutr. Biochem.* 63. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.08.013.