

**Josiane Fernandes da Silva**

**Estudo das alterações vasculares em modelo murino de obesidade  
induzida por dieta hiperglicídica e avaliação da eficácia do  
treinamento físico de intensidade moderada**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte**

**2015**

**Josiane Fernandes da Silva**

**Estudo das alterações vasculares em modelo murino de obesidade  
induzida por dieta hiperglicídica e avaliação da eficácia do  
treinamento físico de intensidade moderada**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte**

**2015**

## **Dedicatória**

**A Deus e a todos que estão e sempre estarão comigo.**

## **Agradecimentos**

À professora Virginia Soares Lemos, minha orientadora, por trilhar esse caminho comigo, me ensinando a arte da pesquisa. Obrigada pelas discussões acadêmicas, pelos conselhos e pelo convívio. Tenho por você uma grande admiração e um exemplo de vida.

Ao professor Cândido Celso Coimbra, meu co-orientador, pelos ensinamentos e por me permitir trabalhar com treinamento físico, disponibilizando o seu laboratório e auxiliando com as discussões. Muito obrigada.

Ao professor Steyner França Cortes, pelas discussões e ajuda nos experimentos.

Ao professor Luciano dos Santos Aggum Capettini, pela ajuda nos experimentos, pelo convívio e pelas inúmeras conversas sobre ciência e sobre a vida.

A Grazielle Caroline da Silva pela sua grande contribuição nesse trabalho e em tantos outros. Por ir comigo ao laboratório, nos finais de semana e feriados (e sempre tinha um feriado!!). Pelas conversas e discussões científicas, pelos conselhos, por tudo.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Fisiologia e Farmacologia, pelo convívio, pela ajuda com os experimentos, pelas discussões científicas, pelas risadas. Vocês tornaram essa jornada mais suave. Adoro todos vocês.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Endócrina e da Reprodução, em especial o Frederico e o Paulo, por compartilhar seus conhecimentos e me ajudar com o treinamento físico dos animais.

Aos membros da banca examinadora pela prontidão em participar desta importante etapa de avaliação do nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia pela oportunidade de realizar este trabalho.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro durante todo o meu doutorado.

***“Guardemos a certeza de que Deus nos criou com todos os recursos que nos capacitam para transformar o ato de existir em uma experiência plena de crescimento e felicidade.”***

**Em “fala, Preto Velho” de Wanderley Oliveira pelo espírito Pai João de Angola.**

## Resumo

Silva, J.F. Estudo das alterações vasculares em modelo murino de obesidade induzida por dieta hiperglicídica e avaliação da eficácia do treinamento físico de intensidade moderada. 2015. 119 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

A obesidade está associada ao aumento do risco para doenças cardiovasculares e metabólicas, como a hipertensão e diabetes. Nessas condições, a inflamação do tecido adiposo contribui para o desenvolvimento das alterações vasculares e agrava o quadro fisiopatológico relacionado com essas doenças. A prática de exercício físico como prevenção das alterações vasculares associadas à obesidade é amplamente recomendada embora não haja consenso de seus benefícios a longo prazo. Objetivos: Investigar os mecanismos implicados nas alterações vasculares em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperglicídica e avaliar a eficácia do treinamento de intensidade moderada na prevenção dessas alterações. Métodos: Foram usados camundongos machos com 12 semanas de vida, C57BL/6J e iNOS<sup>-/-</sup>, divididos em 4 grupos: sedentário controle (SC); sedentário dieta hiperglicídica (SD), exercício controle (EC) e exercício dieta hiperglicídica (ED). Os animais foram tratados com ração controle ou com dieta hiperglicídica, constituída de ração controle enriquecida com leite condensado e açúcar, por 8 semanas. Foi realizado um protocolo de treinamento físico em esteira, gradativo em intensidade, cinco dias por semana, concomitantemente ao tratamento com a dieta. Alterações de peso corporal, de depósitos de gorduras e de parâmetros metabólicos, inflamatórios e hormonais foram analisados. A reatividade vascular da aorta e da mesentérica foram mensuradas em banho de órgão utilizando transdutores isométricos. As expressões proteicas da iNOS, da eNOS, da COX-2, do receptor-1 para o TNF $\alpha$ , da subunidade p65 do NF $\kappa$ B foram avaliadas por Western Blot. A pressão arterial e a frequência cardíaca foram registradas usando a técnica de pletismografia de cauda. A produção basal de NO na aorta dos animais foi estimada pela dosagem indireta com diaminaftaleno e pela microscopia de fluorescência usando a sonda DAF-FM. Resultados: A dieta induziu o aumento do depósito de gordura

visceral, das concentrações séricas de insulina, de leptina, de colesterol total, da fração de LDL, da relação LDL/HDL e de TNF $\alpha$ . Os animais obesos apresentaram aumento de TNF $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 no tecido adiposo mesentérico, epididimal e retroperitoneal, mas não no tecido adiposo periaórtico. O treinamento físico reduziu o ganho de peso, os depósitos de gordura e as concentrações de colesterol e de LDL dos animais ED. Ele preveniu o aumento da produção de citocinas, de insulina e leptina induzida pela dieta hiperglicídica. Não houve alteração das concentrações séricas de glicose, ácidos graxos e triglicérides, como também não encontramos mudanças na pressão arterial e na frequência cardíaca entre os quatro grupos experimentais. Quanto à reatividade vascular da aorta, não foi observada diferença no relaxamento induzido pela acetilcolina entre os grupos. No entanto, a resposta contrátil à fenilefrina se mostrou diminuída no grupo SD e não foi prevenida pelo treinamento no grupo ED. Essa diferença não foi observada nos vasos sem endotélio ou após o pré-tratamento com L-NAME (300 $\mu$ M) ou com L-NIL (10 $\mu$ M), sugerindo que essa disfunção é dependente do aumento da produção endotelial de NO pela iNOS. A aorta dos animais dos grupos SD e ED também apresentou aumento da expressão da iNOS, do receptor-1 para o TNF $\alpha$ , e da produção basal de NO. Na artéria mesentérica, os animais obesos apresentaram uma disfunção vascular caracterizada por uma menor resposta vasodilatadora à acetilcolina e uma maior resposta contrátil à fenilefrina em relação aos animais do grupo SC. A hipercontratilidade mesentérica foi prevenida pelo treinamento físico ou pelo pré-tratamento com ibuprofeno (10 $\mu$ M), ou com celecoxibe (10 $\mu$ M), ou com antagonista dos receptores TP (SQ29548, 10 $\mu$ M). Esses resultados sugerem que a dieta estimulou a via da COX-2 e a produção de prostanóides contráteis na artéria mesentérica. A artéria mesentérica dos animais obesos apresentou maior expressão da COX-2, do receptor-1 para o TNF $\alpha$  e da subunidade p65 do NF $\kappa$ B. Esse aumento foi prevenido pelo treinamento físico. Nos animais iNOS<sup>-/-</sup> e nos animais com silenciamento agudo da iNOS alimentados com a dieta hiperglicídica não foram observados a diminuição da contratilidade da aorta e o aumento da contratilidade da artéria mesentérica. Conclusões: Os animais obesos apresentaram alterações vasculares e metabólicas semelhantes às observadas em humanos obesos, como o aumento do tecido adiposo visceral, o aumento dos níveis circulantes de colesterol e da fração LDL do colesterol, e

alterações vasculares que variaram conforme o leito vascular estudado. A alteração da função vascular, tanto da aorta quanto da artéria mesentérica, estava relacionada com as modificações induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias advindas do tecido adiposo adjacente e da corrente sanguínea. Essas citocinas levaram à ativação da via do TNF $\alpha$ /receptor-1 do TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B, com consequente expressão da iNOS e da COX-2. Finalmente, o treinamento físico, quando introduzido juntamente com a dieta, preveniu o aparecimento de efeitos indesejáveis induzidos pela obesidade, como a disfunção vascular da artéria mesentérica, o estado pró-inflamatório dos animais obesos e alterações metabólicas. Esses resultados mostram a eficácia do exercício físico como terapia não-farmacológica na prevenção dos efeitos deletérios da obesidade

Palavras chaves: obesidade, inflamação, disfunção vascular, exercício físico.



## Abstract

Silva, J.F. Study of vascular alterations in a murine model of obesity induced by high-carbohydrate diet and evaluation of the moderate intensity physical training effectiveness. 2015. 119 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

Obesity is an important risk factor for many cardiovascular diseases such as hypertension, atherosclerosis and diabetes. Under this condition, the adipose tissue inflammation contributes to the development of vascular alterations and intensifies the related pathophysiological stages of these diseases. The practice of physical activity as prevention of vascular changes associated with obesity is widely recommended although there is no consensus of its long-term benefits. The aim of this study was to investigate the impact of physical training on vascular and metabolic changes induced by a high-carbohydrate diet. Methods: C57BL/6J mice (12 weeks) were randomly assigned into four groups: untrained + standard diet (SC); untrained + high-carbohydrate diet (SD); trained + standard diet (EC) and trained + high-carbohydrate diet (ED). The animals were fed either standard chow or with high-carbohydrate diet that was enriched with condensed milk and sugar, during eight weeks. Simultaneously, low intensity exercise training (60% of maximal speed of maximal exercise test) was performed on a motor treadmill five days/week. We assessed body weight, perivascular, mesenteric, testis and retroperitoneal fats. Metabolic, inflammatory and hormonal parameters were evaluated using specific commercial kits. Vascular reactivity in aortic and mesenteric arteries rings was assessed in an organ bath using isometric transducers. Systolic blood pressure and heart rate were measured by tail pletismography. Protein expressions of the iNOS, eNOS, COX-2, receptor-1 to TNF, the p65 subunit of NFκB were assessed by Western blot. The basal production of nitric oxide in the aorta was estimated by indirect dosage with diaminonaphthalene and by fluorescence microscopy using DAF-FM probe to NO. Results: High-carbohydrate diet induced an increase of visceral fat, and of the concentrations of total cholesterol, especially LDL fraction, insulin, leptin. The obese mice showed increased pro-inflammatory cytokines production on the

mesenteric adipose tissue, epididymal and retroperitoneal. It is also observed a raise of TNF $\alpha$  in the obese animal serum. The periaortic adipose tissue of animals showed no change in TNF $\alpha$  and MCP-1 secretion profile. Physical training reduced weight gain, fat deposits, and concentrations of cholesterol and LDL in the ED group. It also prevented the increase of cytokine production in the serum and adipose tissue, and prevented the raise of insulin and leptin-induced high-carbohydrate diet. There was no change in serum concentrations of glucose, fatty acids and triglycerides, glucose tolerance test, blood pressure, heart rate among the four experimental groups. Data from vascular reactivity showed a contractile dysfunction, characterized by decreased response to phenylephrine in the aorta of animals SD compared to animals SC. This difference was endothelium-dependent and reverted by the pre-treatment with L-NAME (300 $\mu$ M) or with L-NIL (10 $\mu$ M). The exercise was unable to restore the contractile response induced by diet (ED group). These results suggest that the dysfunction is dependent on the increased production of NO by inducible isoform of nitric oxide synthase. The aorta of the ED group's animals also showed increased expression of the iNOS, receptor for TNF-1, and basal NO production. In the mesenteric artery of obese sedentary group, we found a vascular dysfunction characterized by increased contractile response to phenylephrine and decreased vasorelaxation response to acetylcholine. These alterations were prevented by exercise training. The mesenteric hypercontractility of SD group also was restored by the pre-treatment with ibuprofen (10 $\mu$ M) or with celecoxib (10 $\mu$ M), or with the TP receptor antagonist (SQ29548, 10 $\mu$ M). These results suggest that the pathway of COX-2 and contractile prostanoids production were stimulated in the SD mesenteric artery by high-carbohydrate diet. The mesenteric artery of obese animals showed higher expression of COX-2, receptor-1 for TNF and p65 subunit of NF $\kappa$ B. These increase was prevented by physical training. In the animals with deletion of the iNOS and in the animals with acute silencing of iNOS, both of them fed with the high-carbohydrate diet, we have not observed the vascular dysfunction. In conclusion: Obese animals showed vascular and metabolic changes similar to those observed in obese human beings, such as increased visceral adipose tissue, increased circulating levels of cholesterol and LDL, and vascular changes that vary depending on the vascular bed. The vascular dysfunction, both in the aorta and in the mesenteric artery, was related to the alterations induced by pro-

inflammatory cytokines arising from the surrounding adipose tissue and bloodstream. These cytokines led to the activation of the TNF  $\alpha$  / TNF $\alpha$  receptor-1 / NF $\kappa$ B, with consequent expression of target genes of this pathway, such as iNOS and COX-2. The physical training was able to prevent the onset of contractile and endothelial dysfunction of mesenteric artery and improves metabolic parameters, probably by reducing the pro-inflammatory state found in obese animals. These results show the efficacy of exercise as therapy in preventing the deleterious effects of obesity.

Key words: obesity, inflammation, vascular dysfunction, exercise training.

## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1</b>	IMAGENS FEITAS DE PREPAROS HISTOLÓGICOS CORADOS COM HEMATOXILINA E EOSINA	23
<b>FIGURA 2</b>	ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO	31
<b>FIGURA 3</b>	POSSÍVEIS MECANISMOS DA VASODILATAÇÃO MEDIADA PELO ÓXIDO NÍTRICO (NO).	34
<b>FIGURA 4</b>	ESTRUTURA E MECANISMO CATALÍTICO DA NOS FUNCIONAL	37
<b>FIGURA 5</b>	ETAPAS DA REAÇÃO DE SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO PELA NOS	38
<b>FIGURA 6</b>	PERFIL DE GLICOSE SÉRICA DURANTE O TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	71
<b>FIGURA 7</b>	PERFIL DA GLICOSE SÉRICA DURANTE O TESTE DE SENSIBILIDADE À GLICOSE	71
<b>FIGURA 8</b>	TRABALHO E VELOCIDADE MÁXIMA DESENVOLVIDOS DURANTE O TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO	72
<b>FIGURA 9</b>	CONSUMO DE OXIGÊNIO (O <sub>2</sub> ) DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS NO BASAL E DURANTE O TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO	73
<b>FIGURA 10</b>	EFICIÊNCIA MECÂNICA (EM) DOS ANIMAIS DURANTE O TESTE DE ESFORÇO FINAL	73
<b>FIGURA 11</b>	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA VASODILATADORA À ACETILCOLINA EM ANÉIS DE AORTA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS SC, SD, EC E ED	74
<b>FIGURA 12</b>	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA VASODILATADORA À ACETILCOLINA EM ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA	75
<b>FIGURA 13</b>	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DE ANÉIS DE AORTA DOS ANIMAIS SC, SD, EC E ED.	76
<b>FIGURA 14</b>	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DE ANÉIS DE AORTA DOS ANIMAIS SC, SD, EC E ED EM RESPOSTA AO KCL	76
<b>FIGURA 15</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DAS ENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) NA HIPORRESPONSIVIDADE	77

AÓRTICA DOS ANIMAIS TRATADOS COM A DIETA HIPERGLICÍDICA

<b>FIGURA 16</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DAS ISOFORMAS CONSTITUTIVAS DAS NOS NA MENOR RESPOSTA CONTRÁTIL DOS GRUPOS SD E ED	78
<b>FIGURA 17</b>	EFEITO INIBITÓRIO DO L-NNA NA RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	78
<b>FIGURA 18</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA ISOFORMA INDUZIDA DA NOS (INOS) NA MENOR RESPOSTA CONTRÁTIL DA AORTA DOS ANIMAIS SD E ED	79
<b>FIGURA 19</b>	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA INOS NA AORTA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	80
<b>FIGURA 20</b>	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DO RECEPTOR-1 PARA TNFA NA AORTA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	80
<b>FIGURA 21</b>	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA eNOS NA AORTA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	80
<b>FIGURA 22</b>	AVALIAÇÃO DO PAPEL DA INOS NA MENOR RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA NA AORTA DOS ANIMAIS COM SILENCIAMENTO AGUDO DA INOS E ANIMAIS COM DELEÇÃO GÊNICA DESSA ENZIMA. TRATADOS COM A DIETA HIPERGLICÍDICA.	81
<b>FIGURA 23</b>	AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA INOS NA AORTA DE CAMUNDONGOS ALIMENTADOS COM A DIETA HIPERGLICÍDICA.	81
<b>FIGURA 24</b>	DOSAGEM INDIRETA DA PRODUÇÃO BASAL DE NO PELO MÉTODO DO DIAMINONAFTALENO (DAN) EM ANÉIS DE AORTA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	82
<b>FIGURA 25</b>	PRODUÇÃO BASAL DE NO EM CORTES HISTOLÓGICOS DE AORTA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.	83
<b>FIGURA 26</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO CICLOOXIGENASE (COX) NA MENOR RESPOSTA CONTRÁTIL DA AORTA DOS ANIMAIS DO GRUPO SD E ED	84
<b>FIGURA 27</b>	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA AORTA. NÃO HOUVE ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE NÚCLEOS (A), NA ESPESSURA DA PAREDE DA AORTA (B) E NA RAZÃO DA	84

ÁREA DA PAREDE PELA ÁREA DO LÚMEN (C) ENTRE OS GRUPOS EXPERIMENTAIS

<b>FIGURA 28</b>	FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE FRAGMENTOS DE CORTES TRANSVERSAIS DA AORTA TORÁCICA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	85
<b>FIGURA 29</b>	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA DOS ANIMAIS SC, SD, EC E ED	86
<b>FIGURA 30</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DAS ENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) NO AUMENTO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DA ARTÉRIA MESENTÉRICA DO GRUPO SD	86
<b>FIGURA 31</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA DAS CICLOOXIGENASE (COX) NO AUMENTO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DA ARTÉRIA MESENTÉRICA DO GRUPO SD	87
<b>FIGURA 32</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA ISOFORMA INDUZIDA CICLOOXIGENASE (COX-2) NO AUMENTO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DA ARTÉRIA MESENTÉRICA DO GRUPO SD	87
<b>FIGURA 33</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TP NO AUMENTO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DA ARTÉRIA MESENTÉRICA DO GRUPO SD.	88
<b>FIGURA 34</b>	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA INOS NO AUMENTO DA RESPOSTA CONTRÁTIL À FENILEFRINA NA ARTÉRIA MESENTÉRICA DOS ANIMAIS DO GRUPO SD	89
<b>FIGURA 35</b>	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CONTRÁTIL DA ARTÉRIA MESENTÉRICA DOS ANIMAIS COM DELEÇÃO GÊNICA A INOS	89
<b>FIGURA 36</b>	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA VASODILATADORA À ACETILCOLINA EM ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA DOS ANIMAIS DO GRUPO SD COM SILENCIAMENTO AGUDO DA INOS	90
<b>FIGURA 37</b>	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA COX-2 (A), P65-NFKB (B) E DO RECEPTOR -1 DO TNFA (C) NA ARTÉRIA MESENTÉRICA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	90

## Lista de tabela

<b>Tabela 1</b>	COMPOSIÇÃO CALÓRICA DAS RAÇÕES	54
<b>Tabela 2</b>	PROTOCOLO DE TREINAMENTO	57
<b>Tabela 3</b>	PARÂMETROS CORPORAIS E ENERGIA INGERIDA EM ANIMAIS TRATADOS COM DIETA HIPERGLICÍDICA E TREINAMENTO FÍSICO.	69
<b>Tabela 4</b>	PARÂMETROS METABÓLICOS E HORMONAIS SÉRICOS EM ANIMAIS TRATADOS COM DIETA HIPERGLICÍDICA E TREINAMENTO FÍSICO	70
<b>Tabela 5</b>	DESEMPENHO DOS ANIMAIS DURANTE O TESTE DE ESFORÇO MÁXIMO	72
<b>Tabela 6</b>	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NOS GRUPOS SC, SD, EC E ED	92

## Lista de Abreviaturas, Símbolos e fórmulas químicas

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub>	Concentração de cálcio no citosol
µg	Micrograma
µM	Micro molar
2R1C	Modelo de hipertensão com dois rins um clipe
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPc	Nucleotídeo cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
Asc	Radical ascorbato
AscH	Ácido ascórbico
ATP	Trifosfato de adenosina
BH <sub>3</sub> H <sup>+</sup>	Radical trihidrobiopterina catiônico protonado em N5
BH <sub>3</sub>	Radical trihidrobiopterina
BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterina
BKCa	Canal para potássio sensível ao cálcio
Ca <sup>2+</sup> - CaM	Complexo cálcio-calmodulina
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloreto de cálcio dihidratado
CaM	Calmodulina
CaMKII	Calmodulina cinase II
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CIF	Fator de influxo para cálcio
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
COX	Enzima Ciclooxygenases
COX-1	Ciclooxygenase do tipo 1
COX-2	Ciclooxygenase do tipo 2
COX-3	Ciclooxygenase do tipo 3
DAF-FM DA	4-amino,5-metilamino-2',7'-difluoresceína diacetato
DAG	Diacilglicerol
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E.L.I.S.A.	Enzime Linked Immunosorbent Assay
EC	Grupo Treinado tratado com ração controle
ED	Grupo Treinado tratado com dieta hiperglicídica
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio



EDTA	Ácido etilenediaminotetracético
eNOS ou NOS III	Isoforma endotelial da óxido nítrico síntase
EPM	Erro padrão da media
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
Fe <sup>2+</sup>	Dióxi-ferroso
Fen	Fenilefrina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
G	Grama
G	Força da gravidade
GLUT 1	Transportador de glucose do tipo 1
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	Receptor acoplado proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
H	Hora
H <sub>2</sub> O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HRP	Peroxidase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IK <sub>Ca</sub>	Canais para potássio sensíveis ao cálcio de condutância intermediária
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina1β
IL-6	Interleucina 6
iNOS ou NOS II	Isoforma induzida da óxido nítrico síntase
iNOS <sup>-/-</sup>	Camundongos com deleção gênica para iNOS
IP <sub>3</sub>	1,4,5-Trifosfato de inositol
IP <sub>3</sub> R	Receptor de IP <sub>3</sub>
IP <sub>3</sub> R-ROC	Canal para cálcio da classe do SOC
IRAG	Receptor de IP <sub>3</sub>
IRS-1	Substrato do receptor de insulina do tipo 1
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilogramas
Kv	Canais retificadores para potássio
L-Arg	L-arginina
L-Cit	L-citrulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	Inibidores não seletivo da NOS
L-NIL	Inibidores seletivo da iNOS
L-NNA	Inibidores preferencial da eNOS e nNOS

Log	Logaritmo
LOX	Enzima Lisil oxidase
M	Metro
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
Mg	Miligramas
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio heptahidratado
Min	Minuto
miosina P	Miosina fosforilada
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve de miosina
MLC-p	MLC fosforilada
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercúrio
MM-ODN	Sequência <i>mismatch</i> de oligodesoxiribonucleotideo
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NCX	Trocador sódio-cálcio
nNOS ou NOS I	Isoforma neuronal da óxido nítrico síntase
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico síntase
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PBS	Solução tamponada de potássio (Phosphate Buffer Solution)
pGC	Guanilato ciclase intrínseca
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina do tipo D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina do tipo E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina do tipo F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina do tipo G <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina do tipo I <sub>2</sub> ou prostaciclina
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinase ativada por cAMP
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase dependente de cGMP
PLA <sub>2β</sub>	Fosfolipase A <sub>2β</sub>

PLC	Enzima fosfolipase C
PMCA	Cálcio ATPase da membrana plasmática
PSS	Solução salina fosfato
PVAT	Tecido adiposo perivascular
Receptor DP	Receptor para PGD
Receptor EP1	Receptor para PGE do tipo 1
Receptor EP2	Receptor para PGE do tipo 2
Receptor EP3	Receptor para PGE do tipo 3
Receptor EP4	Receptor para PGE do tipo 4
Receptor FP	Receptor para PGF
Receptor IP	Receptor para PGI
Receptor R1	Receptor para TNF
Receptor TP	Receptor para tromboxano
RLC	Cadeia leve regulatória da miosina
RS	Reticulo sarcoplasmático
RyR	Receptor para rianodina
SC	Grupo sedentário tratado com ração controle
SD	Grupo sedentário tratado dieta hiperglicídica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	sodiumdodecyl (lauryl) sulfate-poliacrilamida
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarcoendoplasmático
sGC	Guanilatociclase solúvel
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCs	Canais para cálcio operados por estoque
SQ29548	Antagonista dos receptores TP
SRA	Sistema renina-angiotensina
STIM	Sensor para depleção de cálcio do interior do RS
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano do tipo A <sub>2</sub>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VOCs	Canais para cálcio operados por voltagem
ZIP cinase	cinase da família ZIP

## Sumário

Introdução .....	23
A importância do Sistema Vascular .....	23
O endotélio vascular .....	27
Contração e relaxamento do músculo liso vascular .....	30
Endotélio e o controle do tono vascular: produção de óxido nítrico (NO) e dos produtos da ciclooxigenases (COX).....	35
Óxido nítrico sintase.....	36
Ciclooxigenases e o metabolismo do ácido araquidônico.....	40
Obesidade e Disfunção vascular .....	42
Treinamento físico e a restauração da função endotelial.....	46
Objetivo .....	50
Objetivo Geral .....	50
Objetivos Específicos.....	50
1. Padronizar o modelo de obesidade em camundongos. ....	50
2. Padronizar um protocolo de treinamento físico de intensidade moderada em esteira para camundongos; .....	50
3. Avaliar as alterações funcionais em um modelo de vaso de condutância (aorta) e em um modelo de vaso de resistência (artéria mesentérica). ....	50
4. Avaliar possíveis alterações morfológicas na aorta. ....	51
5. Avaliar marcadores pró e anti-inflamatórios nos animais obesos e treinados.....	51
Metodologia.....	53
Cuidados Éticos: .....	53
1. Animais:.....	53
2. Treinamento .....	55
3. Parâmetros analisados e tecidos e órgãos coletados .....	58
4. Análise de parâmetros metabólicos e inflamatórios .....	58
5. Avaliação da pressão sistólica e frequência cardíaca .....	59

6. Avaliação da função vascular .....	59
7. Determinação da expressão proteica da iNOS, eNOS, COX-2, subunidade p65 do NFkB e receptor-1 do TNF $\alpha$ por Western blot.....	62
9. Análise histológica da aorta.....	65
10. Análise estatística .....	66
Resultados .....	68
1 - Padronização do modelo de obesidade em camundongos e avaliação do efeito do treinamento físico: .....	68
1.1 - Ganho de peso dos animais e depósitos de tecido adiposo retroperitoneal, mesentérico, epididimal e periaórtico; .....	68
1.2 - Níveis séricos de glicose, triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, insulina e leptina. ....	69
1.3 - Avaliação da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina nos animais dos quatro grupos experimentais. ....	71
2 – Treinamento físico dos animais.....	72
3 – Avaliação das alterações funcionais em um modelo de vaso de condutância (aorta) e em um modelo de vaso de resistência (artéria mesentérica). ....	74
3.1 - Investigação dos mecanismos envolvidos nas alterações de resposta relaxante .....	74
3.2 – Investigação das alterações de resposta contrátil na aorta .....	75
4.- Avaliação de marcadores pró e anti-inflamatórios. ....	91
Discussão.....	94
Conclusão .....	108
Referências .....	110

# *Introdução*

# Introdução

## Introdução

### A importância do Sistema Vascular

As fisiopatologias que alteram a funcionalidade do sistema vascular, como a obesidade e a aterosclerose, estão descritas em inúmeros trabalhos publicados em revistas e periódicos de grande impacto no meio acadêmico-científico [1, 2]. A preocupação com o desenvolvimento destas doenças está relacionada aos danos induzidos ao sistema vascular que acarretam impactos negativos sobre os demais sistemas do organismo [3-6] e diminuem a sobrevivência do paciente, deixando-o predisposto a desenvolver outras doenças, como a hipertensão, o infarto e o diabetes *Mellitus* [4, 7].

O sistema vascular é constituído por um circuito fechado de tubos, com estrutura diferenciada para transportar o sangue com velocidade e pressão ideais para perfusão adequada dos tecidos [8]. Cada segmento desse circuito, ou seja, cada tipo de vaso sanguíneo apresenta características morfofisiológicas específicas, correspondente às funções que exercem [5, 8]. Essas diferenças estruturais e funcionais permitem a divisão dos vasos em artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias (figura1).

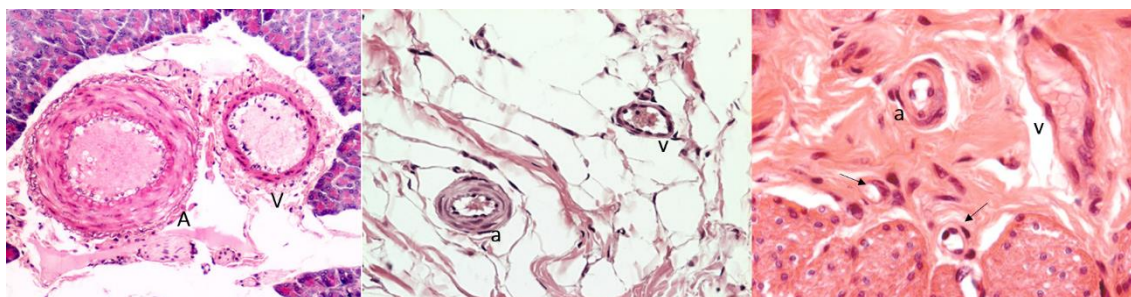


Figura 1- Imagens feitas de preparos histológicos corados com hematoxilina e eosina. As imagens foram retiradas do tutorial MOL, desenvolvido para o estudo de Histologia Geral, pelo Prof. Dr. Paulo A. Abrahamsohn. Módulo 11 – Aparelho circulatório, lâminas: 11-10; 11-13 e 11-19. A: artéria de médio calibre, V: veia de médio calibre, a: arteríola, v: vênula e setas: capilares. Disponível no site <http://www.icb.usp.br/mol>. Acesso em 22 de março de 2015 às 21 horas.

## Introdução

---

As artérias possuem paredes mais fortes, com uma camada média mais espessa, constituída de grande quantidade de fibras elásticas e células musculares. A camada mais interna da artéria é formada por células endoteliais e a mais externa, chamada de camada adventícia, possui principalmente, tecido conjuntivo. O sangue circula pelas artérias sob alta pressão e velocidade. Um exemplo é a aorta, a artéria de maior calibre do corpo, que aumenta o seu diâmetro, acomodando, praticamente, todo o volume de sangue que é ejetado a cada sístole cardíaca. Essa capacidade das artérias de aumentar o seu diâmetro vascular é chamada de distensibilidade (complacência) vascular. Devido a elasticidade arterial, as artérias conseguem retornar ao seu diâmetro inicial à medida que o sangue flui para o próximo segmento vascular. A complacência e a elasticidade aórtica juntas trazem outra consequência que merece destaque, ela transforma o fluxo sanguíneo intermitente, gerado pelos batimentos cardíaco, em fluxo contínuo para o restante da circulação [8-10].

Como as características acima descritas são importantes para manutenção do fluxo sanguíneo ideal, alterações na parede vascular da aorta, ou de outras artérias, em decorrência de doenças ou do processo de envelhecimento, também têm sido alvos de vários estudos [11-13]. Por exemplo, Chen e colaboradores mostraram que a obesidade em camundongos se relaciona com uma maior fragmentação e desorganização da elastina presente na parede vascular da aorta, desencadeando mudanças que resultam na rigidez arterial. Essa desestabilização da rede de fibras elástica em camundongos obesos está associada a uma menor atividade da enzima lisil oxidase (LOX), responsável pela formação de pontes intra- e intermoleculares entre as fibras de colágeno e elastina. Além disso, a inflamação do tecido adiposo perivascular da aorta desses animais também pode contribuir para o aumento da degradação da elastina, devido à ativação de metaloproteinases presentes na matriz extracelular [14].

O próximo conjunto vascular é constituído pelas pequenas artérias e as arteríolas, que são ramificações finais do sistema arterial. A camada média desses vasos apresenta uma maior quantidade de músculo liso vascular e uma quantidade reduzida de fibras elásticas quando comparada às grandes artérias,



## Introdução

---

guardadas as devidas proporções. Essas características histológicas permitem que esses vasos controlem o fluxo sanguíneo em resposta a variação de fatores humorais, neurais ou químicos locais [15, 16]. A contração da camada muscular das arteríolas pode chegar a ocluir o seu lúmen e, assim, impor uma maior resistência à passagem do sangue. Por outro lado, o relaxamento dessas células resulta em um aumento do diâmetro da arteríola e, conseqüentemente, em uma redução na resistência vascular à passagem do fluxo sanguíneo [8, 10]. Nesse ponto, é importante lembrar o conceito de pressão arterial. A pressão arterial é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, portanto, aumento na resistência pode resultar em maiores valores de pressão arterial [9]. Quando a pressão arterial sistólica é igual ou superior a 140 mmHg e/ou a pressão diastólica é igual ou superior a 90 mmHg, caracteriza-se a hipertensão arterial [17]. A hipertensão é um problema de saúde pública global, atingindo quase um bilhão de pessoas em todo o mundo [17]. Várias doenças, como a obesidade, que levam a disfunção vascular, podem induzir o desenvolvimento da hipertensão [9], justificando os estudos que visam esclarecer os mecanismos envolvidos nessas doenças [7, 12, 18]. No entanto, modelos experimentais que apresentam apenas uma dessas doenças podem ajudar a compreender quais alterações vasculares são decorrentes da obesidade e quais são resultados da hipertensão.

Continuando o circuito vascular, as arteríolas se ramificam e em sua extremidade inicia-se uma rede de vasos de menor calibre, os capilares. A sua parede vascular é especializada em realizar trocas de gases, nutrientes e células entre o sangue e o líquido intersticial do tecido adjacente, sendo constituída de uma camada de células endotelial e sua lâmina basal [5, 8, 10]. Portanto, a integridade dos capilares é essencial para manutenção do fluxo de nutrientes e preservação da função tecidual. Doenças provocadas pelo tabagismo, dislipidemia ou outros fatores podem afetar a integridade das células endoteliais e, conseqüentemente, a função dos capilares, resultando em danos teciduais [19, 20].

Os capilares se fundem formando as vênulas que, por sua vez, coalescem e formam vasos de maior calibre, as veias. As veias transportam o sangue de

## Introdução

---

volta ao coração, finalizando o sistema vascular. O sangue flui pelas veias em baixa pressão, não havendo necessidade de paredes espessas e fortes para suportar uma força pressórica elevada. Assim, as veias apresentam paredes mais finas, quando comparadas às artérias, com poucas células musculares lisas e maior proporção de fibras elásticas. Devido a presença de fibras elásticas, as veias são bastante distensíveis e atuam como importante reservatório de sangue para o sistema circulatório, podendo ser acionadas conforme a necessidade do organismo como, por exemplo, durante uma sessão de treinamento físico, na qual os indivíduos apresentam um maior retorno venoso e consequente aumento do débito cardíaco [21]. Em algumas doenças, como na insuficiência venosa crônica, alterações hemodinâmicas do fluxo sanguíneo venoso, tais como o aumento do fluxo retrógrado venoso e a hipertensão venosa, podem ocorrer, bem como alterações estruturais da parede e das válvulas venosas, resultando na formação das veias varicosas [22].

Em termos gerais, a função primordial do sistema vascular é a de suprir as necessidades metabólicas dos tecidos corporais e, para isso, suas características físicas são ajustadas à função de cada segmento deste sistema, como exemplificado acima. Os estudos de alterações vasculares levam em consideração essas diferenças, e alguns trabalhos mostram que um mesmo estado patológico pode desencadear alterações distintas se compararmos diferentes leitos vasculares. Por exemplo, Mendizábal e colaboradores mostraram que existem diferenças na resposta vascular a agentes contráteis e relaxantes na aorta em relação a artéria mesentérica de ratos espontaneamente hipertensos e obesos. Os pesquisadores citados acima mostraram, também, que as referidas artérias respondiam diferente ao tratamento com glitazonas, fármacos que aumentam a sensibilidade dos tecidos à insulina [23]. A diferença de respostas vasculares também poderia estar relacionada a outros fatores como, por exemplo, ao gênero [24], no entanto, os mecanismos envolvidos que explicam essa diferença ainda não estão completamente esclarecidos.

Um destaque deve ser dado ao endotélio, que recobre a camada interna de todo o sistema vascular, desde o coração e passando por todos os tipos de vasos [5]. Ele funciona como um sensor, adaptado às características do

## Introdução

---

ambiente local, e que apresenta uma forte integração entre suas células e o músculo liso vascular, através das junções intercelulares entre as células endoteliais e até mesmo entre essas células endoteliais e as fibras do músculo liso vascular [25, 26]. Assim, a célula endotelial é capaz de detectar variações metabólicas, de fluxo, de mediadores químicos, e transmiti-las para as demais camadas da parede. Além disso, ela é capaz de responder a essas variações, desencadeando uma série de reações que resultam no ajuste da função vascular ao novo ambiente. Portanto, alterações na função endotelial podem justificar as diferentes respostas vasculares no desenvolvimento dos processos patológicos, porém, mais estudos são necessários para compreendermos melhor como essas alterações se desenvolvem nos diferentes leitos vasculares, em condições patológicas.

### **O endotélio vascular**

Atualmente, o endotélio não é considerado apenas como uma camada linear de células especializadas em trocas gasosas e de nutrientes entre o sangue e o tecido adjacente. Ele pode ser compreendido como um “órgão” metabolicamente ativo, heterogêneo e dinâmico [6], que participa de várias funções biológicas importantes, como, por exemplo, do controle da permeabilidade vascular, da proliferação de células musculares lisas, da imunidade inata e adaptativa, da homeostase sanguínea e da regulação do tonos vascular.

Para executar essas funções, o endotélio expressa, sintetiza e libera substâncias bioativas de ação parácrina. Moncada e colaboradores foram os pioneiros na identificação de substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio, em 1977. Eles mostraram que a camada íntima da parede vascular produzia uma substância com ação vasodilatadora e inibitória da agregação plaquetária, denominada por eles, como prostaciclina ou PGI<sub>2</sub>. Foi a primeira publicação que sugeriu um papel importante do endotélio no controle vasomotor e uma

## Introdução

---

explicação para ausência da formação de trombos na presença de um endotélio saudável [27].

Atualmente, já se sabe que as células endoteliais formam uma superfície não-trombogênica, que impede a aderência de plaquetas e de outras células sanguíneas, bem como a ativação da cascata da coagulação do sangue. As principais moléculas envolvidas nessa função do endotélio são a enzima ecto-ADPase (que degrada o ADP proveniente da agregação plaquetária, limitando a extensão dessa agregação), a prostaciclina ( $PGI_2$ ) e o óxido nítrico (NO).

A importância do óxido nítrico e seu papel determinante como mediador de várias funções do endotélio começaram a ser descritos por Furchgott e Zawadzki, em 1980. Eles verificaram que a presença do endotélio era essencial para o efeito vasodilatador da acetilcolina em anéis de aorta de coelho e concluíram que a acetilcolina agia no receptor muscarínico da célula endotelial, estimulando a produção de um fator relaxante que induzia o relaxamento das células do músculo liso vascular [28]. A partir dessa descoberta, alguns esforços foram feitos para identificação desse “fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)”. Em 1987, separadamente, dois grupos de pesquisadores conseguiram esse feito. Ignarro [29] e Palmer [30], e seus respectivos colegas, demonstraram que o EDRF era o óxido nítrico, capaz de estimular a enzima guanilato ciclase e aumentar a produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) em vários tecidos [31], mas que, até então, não tinha sido identificado como mediador endógeno do organismo [32].

Depois da descoberta do NO e a sua relação com o endotélio, verificou-se que, além do seu efeito vasodilatador e anti-trombogênico, o NO produzido pelo endotélio modulava outros processos, como crescimento da parede vascular, onde o NO pode atenuar a hipertrofia e a hiperplasia das células do músculo liso vascular estimulada por endotelina-1 e angiotensina-2 [33]. Além disso, estudos mostraram que alterações na produção de NO pelo endotélio estavam relacionadas ao desenvolvimento e progressão de várias doenças, como na obesidade e na lesão pulmonar aguda [3, 34].

## Introdução

---

Além do óxido nítrico e da prostaciclina, o endotélio é capaz de produzir o EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio). Sua natureza química ainda não foi bem definida. Alguns trabalhos sugerem que o EDHF seja um fator humoral produzido pelo endotélio, podendo ser o potássio (K<sup>+</sup>) [35], o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [36], a anadamida [37] ou metabólitos do ácido araquidônico derivados do citocromo P-450 [38], que hiperpolarizariam a célula muscular lisa, induzindo uma resposta vasodilatadora [39]. Porém, outros trabalhos sugerem que o EDHF seja um fenômeno elétrico que se propaga do endotélio para a célula muscular, através de junções do tipo GAP existentes entre a célula endotelial e a célula do músculo liso vascular, chamadas de junções GAP mio-endoteliais, que também poderiam levar à hiperpolarização da célula muscular [26, 39]. Apesar de não existir uma definição quanto a sua natureza, o EDHF promove o relaxamento da célula muscular lisa, principalmente, de artérias de resistência, exercendo um papel importante na resposta vasodilatadora de vários leitos vasculares, como a artéria mesentérica, carótida, coronária e renais, contribuindo para o controle do tono vascular dessas artérias [39].

O endotélio também expressa receptores em sua membrana celular que reconhecem glicoproteínas presentes na superfície de leucócitos, controlando, assim, a adesão e migração dos mesmos. Esses receptores e glicoproteínas são denominados de moléculas de adesão, sendo divididas em três classes: integrinas, selectinas e a superfamília de imunoglobulinas [40]. Quando o endotélio é ativado, por exemplo, em resposta a doenças inflamatórias e no desenvolvimento de lesão aterosclerótica, a expressão dessas moléculas está aumentada, sugerindo uma participação importante do endotélio e das moléculas de adesão em processos inflamatórios e na aterogênese [40].

Outros importantes fatores vasoativos também são produzidos pelo endotélio, como outros prostanoides e eicosanoides derivados da via das ciclooxigenases e do metabolismo do ácido araquidônico [41]. A endotelina-1, um peptídeo de 21 aminoácidos, também é produzida pelo endotélio e é considerada um potente vasoconstritor, além de ser um agente mitogênico das células do músculo liso vascular [33, 42]. Além disso, o endotélio possui um

## Introdução

---

sistema renina-angiotensina (SRA) local completo, incluindo a enzima conversora de angiotensina e os receptores da angiotensina II. O SRA participa ativamente do controle da pressão arterial [7].

Todas essas ações desenvolvidas pelo endotélio demonstram a importância da funcionalidade da camada endotelial para manutenção da homeostasia do sistema vascular e também justificam os inúmeros estudos que visam entender as alterações na função endotelial envolvidas em processos patológicos. Uma dessas alterações está relacionada ao controle da resposta constritora e relaxante do músculo liso vascular.

### **Contração e relaxamento do músculo liso vascular**

Mudanças na concentração de cálcio no citosol,  $[Ca^{2+}]_c$ , e no grau de fosforilação das proteínas contrácteis são os principais mecanismos que regulam o estado contráctil das células do músculo liso vascular. Um aumento ou diminuição da  $[Ca^{2+}]_c$  nessa célula resulta, respectivamente, em contração ou relaxamento vascular. Em condições fisiológicas, o músculo liso vascular encontra-se parcialmente contraído (tono vasomotor) sob a influência de vários tipos de sinais regulatórios, como neural, endotelial, humoral e miogênico [43].

De uma forma geral, existem duas formas de iniciar a contração na célula muscular lisa, chamadas de acoplamento eletromecânico e de acoplamento farmacomecânico. O primeiro ocorre em consequência da despolarização da membrana da célula muscular, que resulta, principalmente, no influxo de cálcio através dos canais para cálcio do tipo L, voltagem dependentes. Esse influxo de cálcio estimula a liberação de mais cálcio dos estoques intracelulares, aumentando a concentração desse íon no citosol e, assim, iniciando o processo contráctil.

O acoplamento farmacomecânico, por sua vez, é ativado pela interação entre um ligante e seu respectivo receptor presente na membrana do músculo liso. A ativação desse receptor de membrana estimula a entrada de  $Ca^{2+}$  na

## Introdução

célula, a liberação desse íon de estoques intracelulares para o citosol e aciona mecanismos intracelulares que aumentam a sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio [44]. Assim, agonistas que ativam receptores acoplados a

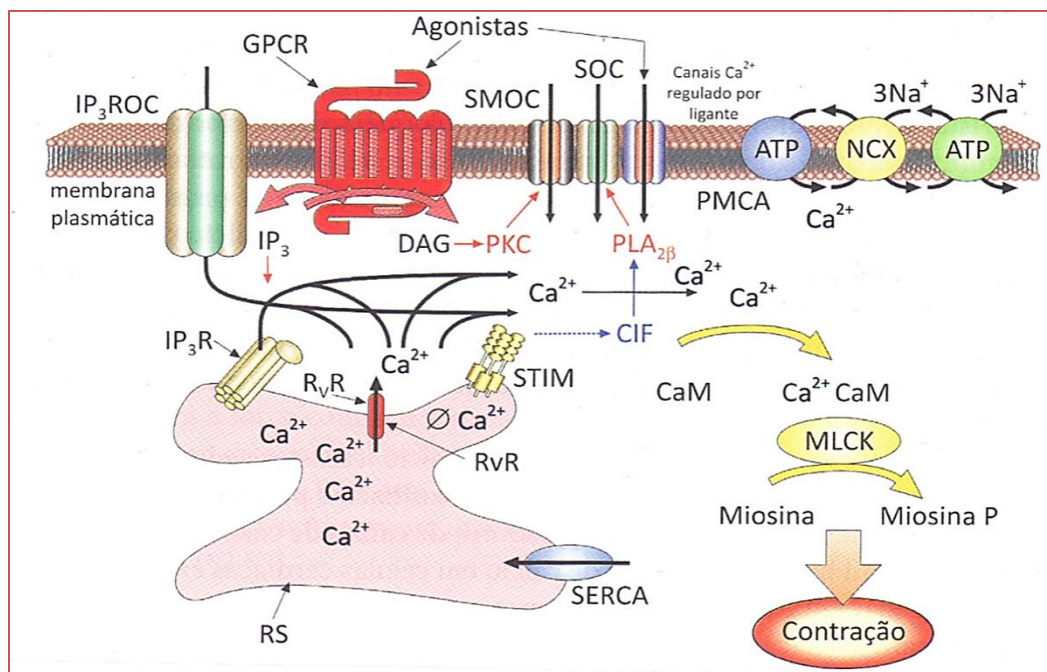


Figura 2 - Acoplamento excitação-contracção do músculo liso. No músculo liso, a contracção pode ocorrer por mecanismo independente de potencial de acção de membrana, porém dependente de agonistas. O influxo de cálcio pode ocorrer via VOCs, por canais regulados por ligantes ou pela liberação de cálcio de estoques do RS via activação de  $IP_3$  R. Em geral, nesse tipo de músculo, o aumento na  $[Ca^{2+}]_c$  é mais lento do que nos outros tipos de músculos, esquelético e cardíaco, devido à particular dependência dos segundos mensageiros,  $IP_3$  e DAG.  $IP_3$  ao activar  $IP_3R$ , além de depletar os estoques de cálcio do RS, poderia acionar os  $IP_3R$ -ROC (também considerado um canal para cálcio da classe do SOC), levando ao influxo de cálcio para o citosol. A concentração de cálcio aumentada no citosol pode estimular a actividade do RyR, auxiliando na depleção dos estoques de cálcio do RS. Além disso, em resposta à depleção dos estoques de cálcio do RS ocorre a oligomerização do STIM, liberando o CIF. O CIF, por sua vez, activa o  $PLA_{2\beta}$ , responsável por activar o Orai (um outro canal para cálcio da classe dos SOC). As diferentes vias, simultaneamente activadas ou não, possibilitam o aumento na concentração citosólica de cálcio, aumentando a interacção  $Ca^{2+}$ -CaM, determinante para aumentar a actividade de MLCK, responsável pela fosforilação da RLC da miosina (miosina P), desencadeando a contracção muscular. A concentração citosólica de cálcio pode ser posteriormente reestabelecida pela actividade da  $Na^+K^+$ -ATPase, bem como de outras ATPases como SERCA e PMCA, além do NCX. VOC – canais para cálcio operados por voltagem; GPCR – receptor acoplado proteína G; RS – retículo sarcoplasmático; RyR – receptor para rianodina;  $IP_3R$  – receptor para trifosfato de inositol;  $IP_3$  – trifosfato de inositol; DAG – diacilglicerol;  $IP_3R$ -ROC – receptor operado por  $IP_3R$ ; SOC – canais para cálcio operados por estoque; STIM- sensor para depleção de cálcio do interior do RS; CIF – factor de influxo para cálcio;  $PLA_{2\beta}$  - fosfolipase  $A_{2\beta}$ ;  $Ca^{2+}$  - CaM – cálcio-calmodulina; MLCK – cinase da cadeia leve de miosina; RLC – cadeia leve regulatória; miosina P – miosina fosforilada; SERCA – cálcio ATPase do retículo sarcoendoplasmático; PMCA – cálcio ATPase da membrana plasmática; NCX – trocador sócio-cálcio. Figura de Silva, B. R. e Bendhack L.M., retirada do capítulo 28 do livro Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares. Resende, R.R., Guatimosim S. e Leite, M. F. 2012. Editora Sarvier [43].

## Introdução

---

proteína  $G\alpha_q$ , como o  $\alpha_1$ -adrenérgico, muscarínicos M1, M3 e M5, no músculo liso vascular levam ao aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  [45]. Essa interação agonista-receptor estimula a enzima fosfolipase C (PLC) que hidrolisa o  $PIP_2$  (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) na membrana plasmática, originando dois importantes mensageiros intracelulares:  $IP_3$  (trifosfato de inositol) e o DAG (diacilglicerol). O  $IP_3$  interage com o seu receptor no retículo sarcoplasmático ( $IP_3R$ ) e estimula a liberação do cálcio para o citosol. Por sua vez, o DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que fosforila canais para cálcio na membrana plasmática, promovendo o influxo de cálcio, figura 2 [43].

A PKC pode estimular também a contração muscular inibindo a miosina fosfatase, enzima que diminui a resposta contrátil, pois reduz a fosforilação da cadeia leve de miosina, reduzindo a interação entre a miosina e a actina para a contração do músculo liso. Esse mecanismo de “inibição da inibição” também está associado à ativação da via Rho-cinase [43, 44, 46].

Após o aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ , devido à mobilização desse íon dos estoques intracelulares ou do influxo do meio extracelular, ele se liga a calmodulina (CaM), formando um complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM, que interage com a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), ativando-a. Esta ativação resulta na fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) em um sítio específico, principalmente, no resíduo de serina na posição 19 da MLC, permitindo que esta clive o ATP e libere energia para interação miosina-actina e, conseqüente, contração celular, figura 2 [43].

Por outro lado, a diminuição da  $[Ca^{2+}]_c$ , como resultado da captação desse íon para dentro do retículo sarcoplasmático ou pela extrusão para o meio extracelular, leva à dissociação do complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM e, portanto, ao relaxamento muscular. Existem vários mecanismos que reduzem o cálcio intracelular, dentre eles os que são mediados pela bomba  $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (PMCA), pelo trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX), pela bomba  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e pelas proteínas ligantes de  $Ca^{2+}$  citosólicas. Acredita-se que os mecanismos que ativam a SERCA e a PMCA são os mais importantes nessa função, figura 3 [46].



## Introdução

---

Outros mecanismos mediadores da vasodilatação envolvem ativação de canais para  $K^+$ , aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) e ativação de fosfatases, como a miosina fosfatase [46, 47]. A ativação da miosina fosfatase diminui a sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio, pois resulta em um menor grau de fosforilação da MLC, contribuindo assim, para resposta de vasodilatação [46].

A ativação de canais para  $K^+$  leva à hiperpolarização da célula muscular lisa, devido ao efluxo de íons  $K^+$ . Essa hiperpolarização resulta em diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  através de canais para cálcio regulados por voltagem [48].

A produção de nucleotídeos cíclicos pode ser estimulada por várias substâncias vasodilatadoras através da ativação de receptores acoplados à proteína G na membrana da célula muscular lisa que ativa a enzima adenilato ciclase, resultando na produção de AMPc a partir do ATP. No entanto, outros vasodilatadores ativam a proteína guanilato ciclase solúvel (como o NO) ou receptores com atividade de guanilato ciclase intrínseca (como o peptídeo natriurético atrial – ANP), levando à produção de GMPc a partir do GTP. Esses mediadores, AMPc e GMPc, por meio da ativação respectiva das proteínas cinases, PKA e PKG, reduzem a concentração intracelular do  $Ca^{2+}$ , por estimulação da SERCA, da PMCA e do NCX. Eles também podem ativar canais para  $K^+$  e diminuir a sensibilidade das proteínas contráteis ao  $Ca^{2+}$ , por fosforilação e inativação da MLCK (via PKA) e ativação da enzima miosina fosfatase, via PKG, figura 3 [46, 49].

Os mecanismos de contração-relaxamento regulam o tono do músculo liso vascular, garantindo a funcionalidade dos órgãos. Vários trabalhos mostraram que, em condições patológicas, ocorrem alterações nesses mecanismos como, por exemplo, na hipertensão arterial. Li e colaboradores mostraram que humanos hipertensos e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam uma maior resposta contrátil a vários agonistas de receptores acoplados à proteína G [50]. Cho e colegas mostraram que o músculo liso da artéria mesentérica de ratos SHR apresenta uma maior resposta contrátil à caliculina A e um maior grau de fosforilação da cadeia leve de miosina, devido, provavelmente, a ação de uma cinase de cadeia leve de miosina independente

## Introdução

de cálcio. Eles ainda sugerem que a ZIP cinase possa ser essa MLCK independente de cálcio e que ela exerça um papel importante no desenvolvimento da disfunção contrátil associada à hipertensão [51]. Por outro lado, Callera e colaboradores demonstraram que alterações nos mecanismos de hiperpolarização do músculo liso também estão associadas à hipertensão. No modelo de hipertensão dois rins um clipe (2R1C), anéis de aorta de ratos hipertensos apresentaram uma menor resposta vasodilatadora à acetilcolina quando comparados aos ratos normais. Essa menor resposta vasodilatadora foi relacionada a menor ativação dos canais para potássio sensíveis ao cálcio ( $BK_{Ca}$ ) [52].

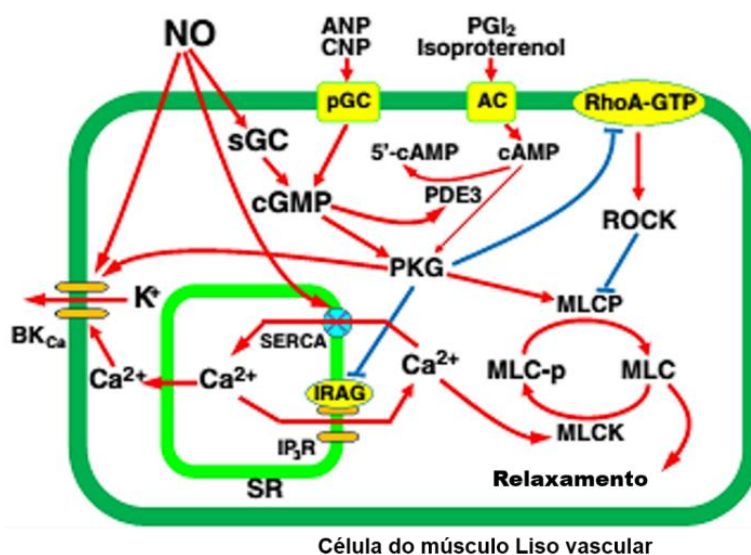


Figura 3 - Possíveis mecanismos da vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (NO). NO induz o relaxamento do músculo liso vascular primariamente por aumentar o conteúdo intracelular de monofosfato ciclo de guanósina (cGMP), resultante da estimulação da guanilato ciclase solúvel (sGC). Subsequentemente, a proteína cinase dependente de cGMP (PKG) é ativada. PKG pode agir inibindo o influxo de  $Ca^{2+}$  pela hiperpolarização da membrana celular estimulação dos canais para  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $BK_{Ca}$ ). PKG pode também reduzir a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SR) via fosforilação do substrato de PKG associado ao receptor de  $IP_3$  (IRAG). Outro importante mecanismo das ações da PKG é através da redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{2+}$ , através da estimulação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) e da inibição da proteína G RhoA-GTP. Essas duas ações interferem com o efeito inibitório da Rho cinase na MLCP. A PKG também pode ser ativada indiretamente pelo cAMP. Em adição a PKG, NO pode induzir a vasodilatação inibir a fosfodiesterase3 (PDE3), que leva a diminuição da degradação do cAMP. O NO também pode estimular a receptação do  $Ca^{2+}$  citosólico via  $Ca^{2+}$ ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA). AC – adenilato ciclase, ANP – peptídeo natriurético atrial, CNP – peptídeo natriurético tipo C, pGC - guanilato ciclase intrínseca,  $PGI_2$  – prostaciclina, MLC – cadeia leve de miosina, MLCK – cinase da cadeia leve de miosina, MLC-p – MLC fosforilada. Linha vermelha indica estimulação, enquanto linhas azuis indicam inibição. Gao, Y., 2009, [49].

## Introdução

---

Na hipertensão e outras condições patológicas, tais como na obesidade e no diabetes *Mellitus*, uma das principais alterações na resposta vasomotora é a que envolve a via da NOS/NO/GMPc. Nessas condições, vários trabalhos relatam uma menor produção de óxido nítrico (NO) ou menor biodisponibilidade desse mensageiro e, em ambos os casos, os autores encontraram uma menor resposta vasodilatadora do músculo liso vascular [1, 23, 53, 54].

Como demonstrado acima, os mecanismos que regulam o estado de constrição e relaxamento dos vasos são complexos e, apesar dos avanços em seu estudo, estamos longe de elucidá-los. Além disso, as alterações nas vias intracelulares variam conforme a doença, o grau de desenvolvimento da mesma e o tecido lesionado, desafiando ainda mais as pesquisas científicas. Portanto, mais pesquisas são necessárias para entendermos melhor as vias intracelulares de controle da resposta vascular e as alterações dessas em condições patológicas e, assim, possibilitar a descoberta de terapêuticas mais eficazes para reverter ou amenizar os danos causados por estas doenças.

### **Endotélio e o controle do tono vascular: produção de óxido nítrico (NO) e dos produtos da ciclooxigenases (COX).**

O endotélio participa do controle do tono vascular através da produção de mediadores químicos que irão induzir uma resposta vasoconstritora (prostaglandina -PGG<sub>2</sub>, endotelina-1, angiotensina II) ou uma resposta vasodilatadora (prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, NO e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio - EDHF) do músculo liso adjacente. Existe, em condições fisiológicas, um equilíbrio na produção desses mediadores. No entanto, uma alteração desta produção pode desencadear ou ser consequência das diversas doenças já citadas, acarretando a disfunção endotelial [1, 3, 55].

# Introdução

---

## Óxido nítrico sintase

O óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira chave, que possui várias funções no organismo. Além das funções já citadas nos tópicos anteriores, o NO participa da modulação de processos cognitivos de aprendizado e memória [56], da regulação neural da pressão arterial [57], da regulação da transcrição gênica [58] e da tradução do mRNA [59].

Um importante mecanismo de inativação do NO é a sua reação com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), resultando na formação de um potente agente oxidante, o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Esse composto pode causar dano oxidativo, nitração e S-nitrosilação de proteínas, lipídios e DNA. Essas reações podem inativar essas biomoléculas, acionando vias de degradação ou até mesmo de morte celular [60].

A produção fisiológica do NO é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que são expressas em vários tecidos do organismo. As NOS são monooxidases com um grupamento heme (heme proteínas) e catalisam a oxidação da L-arginina, na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH), tendo como produto a L-citrulina e o NO [61].

Em mamíferos, são conhecidas três isoformas da NOS: a constitutiva NOS neuronal (nNOS ou NOS I), a NOS induzida (iNOS ou NOS II), e a constitutiva NOS endotelial (eNOS ou NOS III). Elas são produtos de genes distintos, mas apresentam um grau de homologia elevado, entre 50-60%. Para o transporte de elétrons dentro da enzima, todas as isoformas da NOS utilizam como cofatores o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), o mononucleotídeo de flavina (FMN), a (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterina ( $BH_4$ ) e, funcionalmente, apresentam-se na forma de homodímero [61].

Cada monômero da NOS é formado por dois domínios, o domínio redutor e o domínio oxidativo, conectados por uma região central de ligação ao complexo cálcio-calmodulina. Para ativação do  $O_2$  molecular, NADPH transfere elétrons para o domínio redutor de um monômero, que contém FAD e FMN. Em seguida, o FMN transfere o elétron para o grupamento heme presente no domínio

## Introdução

oxidativo do outro monômero, onde se encontra também a  $BH_4$  e o substrato. O grupamento heme reduzido pode se ligar e ativar  $O_2$  para a síntese do NO, figura 4 [61, 62].

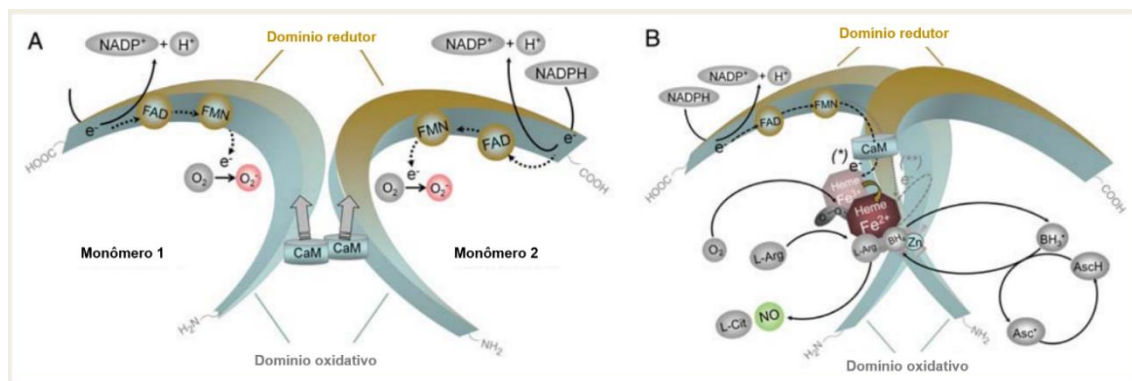


Figura 4- Estrutura e mecanismo catalítico da NOS funcional. (A) Os monômeros da NOS são capazes de transferir elétrons do Fosfato de Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH) reduzido para dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e esse para o mononucleotídeo de flavina (FMN) e têm uma capacidade limitada de reduzir oxigênio molecular para superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Monômeros e domínios de redutores isolados podem se ligar a calmodulina (CaM), o que aumenta a transferência de elétrons dentro do domínio de reductor. Os monômeros da NOS são incapazes de se ligar ao co-fator (6R-)5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) ou ao substrato L-arginina e não podem catalizar a produção de NO. (B) Na presença de grupamento heme, NOS pode formar um dímero funcional. O grupamento heme é essencial para a transferência de elétrons entre os domínios, da flavina para o grupamento heme do monômero oposto. Devido às diferenças no sítio de ligação a calmodulina, o aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  é necessária para ligação da calmodulina (e, conseqüentemente, para a atividade catalítica) a nNOS e eNOS, enquanto calmodulina se liga à iNOS, com grande afinidade, mesmo em baixas concentrações de  $Ca^{2+}$ . Quando o substrato L-arginina (L-Arg) e o co-fator  $BH_4$  estão presentes em quantidades suficiente, os dímeros da NOS intacta acoplam seus grupamentos hemes e a redução de  $O_2$  para a síntese de NO (NOS totalmente funcional). L-citrulina (L-Cit) é formada como subproduto. Para maior clareza, o fluxo de elétrons é somente mostrado do domínio reductor de um monômero para o domínio oxidativo de outro monômero. A NOS apresenta dois estágios de oxidação separados: um para a forma  $N^{\omega}$ -hidroxil-L-arginina e um segundo para converter esse intermediário para L-citrulina e NO. Todas as isoformas NOS contêm um íon zinco (Zn) coordenados em uma conformação tetrahedral com pares de motivos CXXXXC na interface do dímero. Esse lugar é o de maior importância para a ligação de  $BH_4$  e L-arginina. (\*) A transferência de elétron de um domínio reductor estimula o íon férrico do grupamento heme da NOS ( $Fe^{3+}$ ) a se ligar ao  $O_2$  e formar espécies dióxi-ferrosas ( $Fe^{2+}$ ). Essas espécies podem receber um segundo elétron, preferencialmente, do (\*\*)  $BH_4$  ou do domínio de reductor. O  $BH_4$  oxidado resultante foi identificado como o radical trihydrobiopterina ( $BH_3^{\bullet}$ ) ou como o radical trihydrobiopterina catiônico protonado em N5 ( $BH_3^+ H^{\bullet}$ ). O radical  $BH_3$  (ou radical catiônico) pode ser reciclado para  $BH_4$  pela própria NOS (usando um elétron fornecido pelas flavinas). Alternativamente, há evidência de que agentes redutores, tais como ácido ascórbico (AscH, que está presente em células em concentrações milimolares), pode reduzir o radical  $BH_3$  novamente para  $BH_4$  (Asc, radical ascorbato). Esquema modificado de U. Förstermann e W.C.Sessa 2012 [61].

A síntese do NO requer dois ciclos de transferência de elétron na enzima. No primeiro ciclo, a NOS consome 1 mol de NADPH para hidroxilar L-arginina e forma  $N^{\omega}$ -hidroxil-L-arginina, composto intermediário ligado à enzima. No ciclo final, a NOS consome mais 0,5 mol de NADPH para oxidar  $N^{\omega}$ -hidroxil-L-arginina, formando a L-citrulina e NO, figura 5 [62, 63].

## Introdução

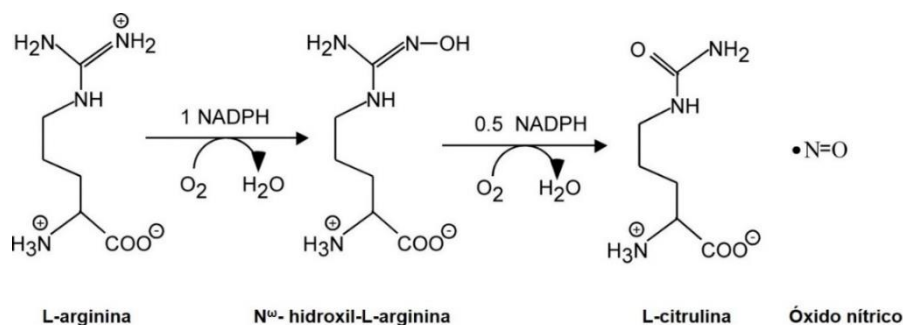


Figura 5 - Etapas da reação de síntese do óxido nítrico pela NOS. Esquema modificado de Dennis J. Stuehret al. 2004. [57].

A quantidade e a velocidade de transferência de elétrons na enzima são pontos de controle importantes para a síntese eficiente do NO. Essa transferência deve respeitar o tempo de restabelecimento do estado redox dos cofatores e a presença de substratos em quantidades ideais, e, assim, minimizar o desacoplamento das etapas de redução do  $\text{O}_2$ , diminuindo a formação de radicais livres, como o  $\text{O}_2^-$ , bem como, a formação de ciclos fúteis [62, 63].

A ligação à calmodulina é outra característica importante das NOS. O fluxo de elétron nas isoformas eNOS e nNOS aumenta (portanto, a síntese de NO também aumenta), quando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina se liga a NOS. Para essas isoformas, a afinidade à calmodulina é dependente do aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , com 50% da atividade máxima da enzima ocorrendo quando a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  está entre 200-400nM [56, 61, 64]. No entanto, para isoforma induzida da NOS, iNOS, em baixas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , a calmodulina já se encontra ligada à enzima [61], fazendo com que a síntese de NO por essa isoforma não seja dependente do aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular [65, 66].

A capacidade de síntese das NOS pode ser modulada por outras modificações na enzima como, por exemplo, o grau de fosforilação de sítios específicos [56, 61], o estado redox do meio intracelular (como as concentrações intracelulares de  $\text{O}_2^-$ ) [62, 63], e o nível de expressão da proteína [65].

A eNOS, como mencionado anteriormente, é uma enzima constitutiva e, por estar associada com a fração subcelular de centrifugação, sugere que seja

## Introdução

---

uma proteína componente de membrana na sua forma inativa, associada a proteínas presentes na membrana do complexo de Golgi ou nas caveolas da membrana celular como, por exemplo, a caveolina-1 [64]. Ela pode ser regulada por fosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina, resultando na ativação ou inibição da enzima. A fosforilação do sítio de serina 1177 da eNOS melhora o fluxo de elétrons na enzima, aumentando em 2-3 vezes a produção de NO, quando comparada a sua produção basal [64]. Em condições patológicas, a ativação da eNOS pela fosforilação encontra-se prejudicada [24].

A produção de NO, pelas células endoteliais, é realizada principalmente pela eNOS. No entanto, conforme Capettini *et. al.* 2008, a isoforma neuronal, nNOS, pode contribuir significativamente para manutenção do tono vascular de camundongos [67].

A isoforma neuronal está relacionada com a regulação da duração da transmissão sináptica no SNC, com a regulação central da pressão sanguínea, com o relaxamento do músculo liso, dentre outras funções. Sua atividade também é regulada pelo complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina e pela fosforilação. A fosforilação do sítio de serina 847 da nNOS, pela calmodulina cinase II (CaMKII), reduz a atividade da enzima, porque inibe a ligação do complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina[56].

Já a isoforma induzida, iNOS, é manifestada, principalmente, após um estímulo inflamatório, como lipopolissacarídeos (LPS), citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6) e outros. Por essas características, tem funções primordiais em processos patológicos, como infecções e doenças auto-imunes [65]. Apresenta uma atividade de produção de NO superior as outras isoformas [64] e seus principais mecanismos de regulação são os que envolvem o controle da sua expressão na célula, como a ativação de fatores de transcrição que controlam a transcrição do gene da iNOS e a estimulação de proteínas que estabilizam o seu mRNA no citoplasma [65, 66].

O NO, como já foi dito, exerce um papel fundamental no controle do tono muscular, contrapondo-se às ações dos mediadores contráteis liberados pelo próprio endotélio ou advindos da circulação [49]. Outros mediadores derivados

## Introdução

---

do endotélio podem também exercer um papel importante no controle da resposta vasomotora [41], principalmente, em condições patológicas, como os produtos do metabolismo do ácido araquidônico [68-71].

### **Ciclooxigenases e o metabolismo do ácido araquidônico**

O ácido araquidônico é formado pelo metabolismo de fosfolípidos da membrana celular e é o principal precursor das prostaglandinas. Ele pode ser metabolizado por vários sistemas enzimáticos, incluindo as ciclooxigenases [70]. Sabe-se que em alguns modelos de hipertensão, como os ratos SHR [70], e na disfunção erétil [68], a via da ciclooxigenase tem uma participação importante, com o conseqüente aumento da produção de fatores contráteis derivados do endotélio.

Existem três isoformas conhecidas das ciclooxigenases, COX-1, COX-2 e COX-3. Os mecanismos de regulação, até o momento, são mais bem conhecidos para isoformas 1 e 2. As enzimas COX-1 e COX-2 apresentam alto grau de homologia, em torno de 65%, mas a expressão e atividade delas podem ser reguladas diferentemente. Por exemplo, ambas as enzimas são ativadas na presença de peróxidos lipídicos, no entanto, a sensibilidade da COX-2 é aproximadamente 10 vezes maior quando comparada à COX-1. Além disso, em baixas concentrações (<10 $\mu$ M), o ácido araquidônico é, preferencialmente, oxidado pela COX-2 [72]. Essa diferença de atividade sugere que: quando ambas as enzimas são expressas, podemos ter uma produção de prostaglandinas derivadas da COX-2, enquanto a COX-1 não está ativa [41].

Na maioria dos tecidos, a COX-1 é expressa constitutivamente, enquanto a COX-2 é induzida por mediadores inflamatórios. No entanto, a expressão constitutiva de ambas as isoformas está presente tanto na célula endotelial quanto na célula do músculo liso vascular, com uma expressão maior da isoforma COX-1 na célula endotelial da aorta de ratos [73]. Além disso, a expressão de COX-1 pode ser modulada pelo estresse de cisalhamento, pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e pela trombina [72]. Na



## Introdução

---

hipertensão e no envelhecimento, parece ocorrer uma mudança no perfil de expressão das COXs (e de outras proteínas da via de sinalização das prostaglandinas), com um aumento da expressão gênica de COX-1, COX-2 e tromboxano sintase na célula endotelial [73].

Vários eicosanoides biologicamente ativos são produzidos pelas enzimas da via das prostaglandinas sintases. As cinco principais prostaglandinas formadas são PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>. Sua produção varia conforme o tecido e as enzimas de síntese de prostaglandinas que esse tecido expressa. Elas agem em receptores de membrana, acoplados a proteínas G, e acionam vários mecanismos intracelulares [41]. A nomenclatura para esses receptores está relacionada ao tipo de prostaglandina ou tromboxano que constitui o seu ligante preferencial, ou seja, receptor DP, EP, FP, IP ou TP [41].

A prostaglandina PGD<sub>2</sub> está envolvida na regulação do sono e em respostas alérgicas, mas, na célula muscular lisa, ela pode induzir vasodilatação se agir em receptores DP ou vasoconstrição se ativar receptores TP [41, 70, 71].

A PGE<sub>2</sub> é a prostaglandina mais abundante do corpo humano. Participa de vários processos fisiológicos, como controle da temperatura corporal, regulação da função renal, secreção e motilidade gástrica, dentre outros. Essa prostaglandina também induz resposta vasomotora contrárias, dependendo de qual dos seus receptores será ativado (EP1, EP2, EP3 e EP4), visto que eles são acoplados a diferentes mecanismos intracelulares [41, 70, 71].

A PGF<sub>2α</sub> é um potente vasoconstritor e age, preferencialmente, no seu receptor FP. Ela pode estar envolvida no processo de parto normal, na absorção de água pelos rins e no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca [41].

A PGI<sub>2</sub> é uma prostaciclina e age, preferencialmente, nos receptores IP. Ela é um potente inibidor de agregação plaquetária e um vasodilatador derivado do endotélio [41].

O tromboxano A<sub>2</sub> é o ligante preferencial dos receptores TP e induz contração do músculo liso vascular, agregação plaquetária, dentre outras ações [41]. Ele está envolvido no processo de envelhecimento, no desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão [23, 40, 55, 70, 71].

## Introdução

---

Além desses mediadores, as COXs são uma fonte de produção de ânion superóxido. As situações patológicas, nas quais ocorre a super-expressão dessas enzimas, normalmente estão associadas a um quadro de estresse oxidativo, com modificação de várias vias de sinalização intracelular em decorrência da oxidação de importantes moléculas, incluindo proteínas, ácidos graxos e o NO [41, 71]. Essas modificações podem contribuir para alterações na resposta vascular e consequente desenvolvimento da disfunção endotelial [23].

### **Obesidade e Disfunção vascular**

A obesidade é caracterizada por um excesso de tecido adiposo oriundo de um desequilíbrio dos estoques energéticos corporal. Esse desequilíbrio pode ser decorrente de um consumo calórico alto e associado a uma baixa taxa de atividade física. A obesidade pode se tornar um quadro patológico complexo, associando-se com outras doenças, como hipertensão e o diabetes *Mellitus* [3].

A obesidade se tornou um quadro fisiopatológico de grande impacto tanto para saúde quanto para economia de uma população. Dados mundiais mostram que aproximadamente 1,5 bilhão de adultos acima de 20 anos estão com sobrepeso e 10% desses são obesos propriamente ditos [74]. No Brasil, o último levantamento do IBGE mostrou um cenário semelhante, no qual o número de homens, acima de 20 anos, com sobrepeso já é maior do que 50%, ou seja, quase o dobro do valor de 20 anos atrás (29,9%). O aumento para as mulheres foi menor, mas não menos preocupante, passando de 41,4% da população feminina em 1989 para 48% em 2008-2009 [75]. Essa realidade social se reflete no cenário político-econômico, sobrecarregando os sistemas de saúde diretamente (como os cuidados preventivos, consultas médicas, medicamentos, internação hospitalares, exames e cirurgias) e, indiretamente, como a ausência no trabalho, tempo de lazer perdido, morbidade e mortalidade [76].

Trabalhos recentes demonstram o papel do tecido adiposo como órgão endócrino ativo, capaz de modular a função metabólica e cardiovascular do organismo através da produção de diversas substâncias bioativas, chamadas de

## Introdução

---

adipocinas. Dentre as várias funções fisiológicas exercidas pelas adipocinas, destacamos a capacidade de algumas delas modular o tono vascular, influenciando, portanto, a função de vários outros órgãos/tecidos [77-79].

Por exemplo, Beltowski *et al.* discutem o papel da leptina no controle da pressão arterial e o envolvimento desta adipocina na hipertensão arterial. Ele destaca a capacidade da leptina em estimular o sistema nervoso simpático e, ao mesmo tempo, ativar mecanismos de vasodilatação periférica, dependente e independente da produção de óxido nítrico pelo endotélio [80]. Chen e colaboradores demonstraram que a adiponectina, outra adipocina produzida pelo tecido adiposo, estimula a produção de NO pelo endotélio [81] e Fésüs e colaboradores classificaram a adiponectina como um novo fator humoral importante no controle da vasodilatação da aorta e de artérias mesentéricas de ratos por ativar canais retificadores para potássio (Kv) na célula muscular lisa [82]. Além de outras adipocinas, os adipócitos também sintetizam e secretam citocinas inflamatórias que interferem na resposta vascular, como TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-1 $\beta$  [3]. As adipocinas e citocinas produzidas pelo tecido adiposo podem exercer sua ação em tecidos distantes do local de sua síntese, via corrente sanguínea, ou no leito vascular adjacente, via parácrina.

Estudos relatam que a síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e resistência à insulina estão mais associadas com a obesidade visceral (aumento do tecido adiposo mesentérico e omental) [83, 84] do que com a alteração de outros depósitos de gordura [85]. Isso decorreria da facilidade com que os ácidos graxos, provenientes de tecido adiposo visceral, teriam para chegar ao fígado, via veia porta [83]. No entanto, os mecanismos envolvidos na adaptação cardiovascular, durante a instalação do quadro de obesidade, bem como as complicações relacionadas a essa doença ainda não foram elucidados.

Em modelos de obesidade associados à resistência à insulina, a disfunção vascular pode estar relacionada a menor ativação da via PI3K/AKT, levando a uma menor produção de NO e, conseqüentemente, menor resposta vasodilatadora [86]. Além disso, o processo inflamatório associado a obesidade pode prejudicar a sinalização intracelular da insulina e contribuir para as alterações vasculares [87, 88]. No entanto, em indivíduos obesos sem

## Introdução

---

resistência à insulina, os mecanismos envolvidos na disfunção vascular não são bem compreendidos, justificando a necessidade de mais estudos que mostram a relação entre a disfunção vascular relacionada a obesidade, na ausência da resistência à insulina.

Além disso, alguns trabalhos sugerem uma participação importante do tecido adiposo perivascular (PVAT), junto com o endotélio, no controle da resposta vasomotora. Lohn e colaboradores mostraram que o PVAT liberava um fator capaz de diminuir o efeito contrátil à fenilefrina, angiotensina II e serotonina em anéis de aorta de ratos. Esse fator agiria através da ativação de canais para  $K^+$  dependente de tirosina cinase [89]. Por outro lado, Gaos e colaboradores observaram que o PVAT exerce seu efeito anticontrátil através de dois mecanismos distintos, um dependente da produção de óxido nítrico endotelial e outro independente do endotélio, com envolvimento do peróxido de hidrogênio e com subsequente ativação da enzima guanilato ciclase solúvel [77].

Algumas das alterações associadas à obesidade estão relacionadas ao aumento do depósito de lipídeo em células não-adipócitas (hepatócitos, células pancreáticas e outras), o que resultaria em mudanças de expressão de proteínas, como receptores ou fatores de transcrição gênica, podendo causar disfunção ou até morte celular [85, 90]. Sharma *et al.* mostraram que o acúmulo de lipídio no músculo cardíaco induz uma disfunção metabólica, podendo levar à resistência à insulina, prejudicando assim a oxidação de glicose, e conseqüentemente, resultando em falência cardíaca [90]. Corroborando esses resultados, o acúmulo de gordura no epicárdio foi relacionado ao espessamento da camada íntima-média, à rigidez vascular e ao estado pró-inflamatório, contribuindo, portanto, para progressão de doenças coronarianas e outras complicações cardíacas [91].

Outro fator importante está relacionado à mudança no perfil de adipocinas secretadas pelo tecido adiposo na obesidade. Observa-se que durante o desenvolvimento da obesidade, os adipócitos passam a produzir, predominantemente, citocinas pró-inflamatórias, gerando um estado inflamatório de baixo grau [3, 85] no indivíduo obeso. Nesse estado, o tecido apresenta-se com células adiposas maiores, mais responsivas às enzimas lipolíticas e em

## Introdução

---

parte resistentes à insulina, o que pode aumentar a liberação de ácidos graxos para a circulação e resultar na diminuição da sensibilidade à insulina na célula muscular e, a longo prazo, no desenvolvimento do diabetes [85]. O aumento da concentração circulante de citocinas pró-inflamatórias pode acelerar o processo de resistência à insulina, pois, citocinas como o TNF- $\alpha$  e IL-6 são capazes de ativar vias de sinalização intracelular, que resultam na fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em serina com efeito negativo na via de sinalização da insulina [92]. No endotélio vascular, essa resistência culminaria em uma menor produção de óxido nítrico, molécula importante na vasodilatação e, assim, iniciaria o processo de disfunção vascular.

Apesar dos estudos sobre disfunção vascular e alteração do tecido adiposo na obesidade, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da disfunção vascular associada à obesidade não estão bem claros, variando sua resposta quanto ao leito vascular estudado e ao modelo animal utilizado [3, 93]. Em algumas doenças relacionadas à obesidade, como a hipertensão, a função vascular pode ser preservada pelo aumento na produção de EDHF em detrimento da produção do óxido nítrico [94]. Chadha *et al.* mostraram que a função vascular da veia safena foi preservada em modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria (alto teor de gordura), devido ao aumento de expressão de canais para potássio sensíveis ao cálcio de condutância intermediária (IK<sub>Ca</sub>) associado a junções mioendoteliais do tipo “gap” [95].

Por outro lado, Roberts *et al.* mostraram que o tratamento de ratos com dieta rica em gordura e açúcares (que mimetiza a dieta usada pela população ocidental) levou à diminuição da expressão e da atividade da proteína óxido nítrico sintase endotelial, resultando em uma menor resposta vasodilatadora da aorta à acetilcolina, devido à diminuição da produção de NO e de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, predispondo os animais à hipertensão arterial e ao desenvolvimento de placa de ateroma [96].

As alterações na produção de adipocinas, bem como a idade de início do desenvolvimento da obesidade também podem contribuir para essas divergências de resultados. Um aumento na produção de leptina, em fase inicial, pode influenciar a distensibilidade arterial, estimulando a produção de NO e,

## Introdução

---

assim, preservando a função vascular. Esses resultados sugerem que, em estágios iniciais do crescimento, o organismo se adapta ao aumento da massa corpórea e consequente aumento do fluxo sanguíneo para esse novo tecido [97, 98]. Em estágios mais avançados do desenvolvimento, por exemplo, na idade adulta, e na presença de um constante desequilíbrio energético, o organismo poderá apresentar comorbidades associada à obesidade.

Dentro desse contexto, apesar das inúmeras hipóteses para as possíveis causas das alterações relacionadas à obesidade, mais estudos precisam ser realizados com vista a esclarecer melhor os processos pelos quais essas alterações se instalam e, dessa forma, contribuir para prevenção e elaboração de tratamentos mais eficazes. Nesse sentido, o treinamento físico tem demonstrado ser um meio de proteção contra a ocorrência de doenças cardiovasculares, reduzindo a mortalidade por fatores relacionados a elas, não só pela redução do acúmulo de tecido adiposo, mas também pela capacidade do treinamento físico melhorar a função vascular [99].

### **Treinamento físico e a restauração da função endotelial**

Atualmente, já é aceito que a função vascular pode ser modulada pela prática regular de exercício físico, sendo a melhora na resposta vasomotora um dos principais benefícios do treinamento físico aeróbio para o sistema cardiovascular [99]. No entanto, a extensão desses benefícios varia conforme o protocolo utilizado, a doença envolvida e o modelo experimental escolhido.

Os mecanismos envolvidos nas alterações promovidas pelo treinamento não estão totalmente esclarecidos [99], podendo relacionar-se com a diminuição da massa do tecido adiposo e com a normalização das concentrações de metabólitos plasmáticos, como colesterol e triglicérides [100]. Outra justificativa do benefício do exercício físico para o sistema cardiovascular são as adaptações que ela promove, por exemplo, na modulação da função cardíaca [101], no aumento da densidade de microvasos no músculo esquelético [100] e no estímulo à produção de NO endotelial [102, 103].

## Introdução

---

Em 1999, Arvola e colaboradores mostraram que o exercício de longa duração previne o desenvolvimento de hipertensão observado em ratos obesos hipertensos não treinados, e que esse efeito estava associado com a melhora na vasodilatação pelo aumento da sensibilidade ao NO na musculatura lisa da artéria carótida e mesentérica [103].

Outros trabalhos demonstraram que a melhora da resposta vasodilatadora com o treinamento físico pode estar relacionada também a um aumento efetivo da produção do NO, devido a uma maior expressão e atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial [101, 102]. Além desses, alguns trabalhos mostraram que a melhora da função vascular seria ocasionada por uma diminuição do estresse oxidativo celular, devido a maior expressão da enzima superóxido dismutase [104, 105], o que resultaria em uma menor degradação do NO. Porém, Young e colaboradores não observaram redução da carga oxidante e do dano mitocondrial em camundongos hipercolesterolêmicos treinados [104].

Além disso, o exercício regular aumenta a sensibilidade à insulina no músculo esquelético e tecido adiposo [106], bem como melhora a eficiência energética do organismo, com um maior consumo de ácidos graxos dentro da mesma capacidade oxidativa [107].

O treinamento físico também pode modular a produção de citocinas em alguns tecidos. Heled e colaboradores verificaram que os animais treinados apresentavam uma maior expressão de TNF $\alpha$ , do seu receptor R1 e do transportador de glucose GLUT 1 no músculo esquelético [108]. Por outro lado, Sheiban *et al.* observou que o exercício físico diminuía os níveis plasmáticos de TNF $\alpha$  em mulheres obesas [109]. Zhang relatou que a diminuição da produção de TNF $\alpha$  e da sua via de sinalização podem contribuir para os efeitos protetores do exercício físico na função vascular [110].

Desse modo, visto que o treinamento físico pode estimular modificações benéficas para o organismo, incluindo a restauração da função vascular em condições patológicas, acreditamos que o treinamento físico poderia atuar como um tratamento não-farmacológico para algumas das alterações associadas à obesidade. Entretanto, como o treinamento físico aeróbico poderia modular a

## Introdução

---

resposta de vasos com diferentes características funcionais, como a aorta e a artéria mesentérica, em um mesmo modelo experimental, ainda não foi estudado e é um objetivo desse trabalho. Além disso, a capacidade do treinamento físico em prevenir alterações vasculares associadas à obesidade, sem a associação de outras doenças, como diabetes e hipertensão, também é um ponto importante que abordaremos no nosso estudo.



*Objetivos*

# Objetivos

---

## Objetivo

### Objetivo Geral

Investigar as alterações vasculares induzidas por dieta hiperglicídica e avaliar os efeitos do treinamento aeróbico de intensidade moderada sobre estas alterações vasculares em um modelo murino de obesidade

### Objetivos Específicos

1. Padronizar o modelo de obesidade em camundongos. Para tal, os seguintes parâmetros específicos foram avaliados:
  - 1.1- Ganho de peso dos animais; aumento de gordura retroperitoneal, mesentérico, epididimal, periaórtica e do tecido adiposo subescapular;
  - 1.2 - Concentrações séricas de glicose, triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, leptina e insulina.
  - 1.3 - Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina nos animais.
2. Padronizar um protocolo de treinamento físico de intensidade moderada em esteira para camundongos;
3. Avaliar as alterações funcionais em um modelo de vaso de condutância (aorta) e em um modelo de vaso de resistência (artéria mesentérica).
  - 3.1 Investigar os mecanismos envolvidos nas alterações de resposta relaxante e os mecanismos implicados nestas alterações;

## Objetivos

---

- 3.2 Investigar alterações de resposta contrátil e os mecanismos implicados nestas alterações;
4. Avaliar possíveis alterações morfológicas na aorta.
5. Avaliar marcadores pró e anti-inflamatórios nos animais obesos e treinados.

*Metodologia*

## Metodologia

### Cuidados Éticos:

O projeto proposto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob protocolo de número 157/11.

### 1. Animais:

Utilizamos camundongos machos C57Bl/6J, com 12 semanas de vida provenientes do centro de bioterismo da UFMG. Camundongos machos com deleção gênica da iNOS, iNOS<sup>-/-</sup>, foram utilizados em alguns experimentos para avaliação dos mecanismos envolvidos na disfunção vascular induzida pela obesidade.

#### 1.1. Modelo Experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos, conforme o desempenho físico alcançado no teste de esforço máximo inicial, para obtenção de grupos homogêneos entre si:

1. Grupo sedentário controle (SC) – recebeu ração controle comercial (Nuvilab®) e não foi submetido ao treinamento físico.
2. Grupo sedentário dieta hiperglicídica (SD) – recebeu a dieta controle enriquecida com açúcar e leite condensado Nestlé® e não foi submetido ao treinamento físico.
3. Grupo Treinado controle (EC) - recebeu ração controle comercial (Nuvilab®) e foi submetido, simultaneamente, a um protocolo de treinamento de intensidade moderada;
4. Grupo Treinado dieta hiperglicídica (ED) - recebeu a dieta controle enriquecida com açúcar e leite condensado Nestlé® e foi submetido,

## Métodos

simultaneamente, a um protocolo de treinamento de intensidade moderada;

Os animais iNOS<sup>-/-</sup> foram divididos em dois grupos:

- 1- Camundongos iNOS<sup>-/-</sup> que receberam a ração controle comercial (Nuvilab®);
- 2- Camundongos iNOS<sup>-/-</sup> que receberam a dieta controle enriquecida com açúcar e leite condensado Nestlé®.

### 1.2. Dieta

A dieta controle consiste de ração Nuvilab CR1 (Nuvital, PR, Brasil), adquirida comercialmente. A dieta hiperglicídica foi composta de 33% de ração controle Nuvilab, 33% de leite condensado Nestlé, 7% de açúcar cristal e 27 % de água [111, 112]. O tratamento teve duração de oito semanas, depois das quais, os animais foram sacrificados por decapitação e os tecidos e órgãos de interesse de estudo foram retirados e acondicionados de maneira apropriada para cada análise.

**Tabela 1 - Composição calórica das rações.**

	Nuvilab (Kcal/100g)	Dieta hiperglicídica (Kcal /100g)
Carboidrato	168	238,4
Proteína	88	57,1
Lipídeo	36	55,1
TOTAL	292	350,6

## 2. Treinamento

### 2.1. Adaptação dos animais à esteira:

Todos os animais foram familiarizados a correr em esteira rolante motorizada (15 minutos/dia à velocidade de 6 metros/minuto), durante 5 dias, antes do teste de esforço máximo inicial.

### 2.2. Protocolo de Esforço Máximo

No final da semana de adaptação à esteira, os animais foram submetidos a um teste progressivo de esforço até a fadiga, em esteira motorizada, com 5° de inclinação e velocidade inicial de 6 metros/minuto. A velocidade foi aumentada em 3 metros/minuto, a cada 3 minutos, até a determinação da fadiga, para a obtenção da velocidade máxima individual [113]. A fadiga foi determinada pela permanência do animal no final da raia de corrida por mais de dez segundos mesmo se estimulado pelo avaliador.

Após o primeiro teste de esforço máximo, os animais foram divididos nos grupos experimentais descritos acima, de forma que em todos os grupos tivessem animais de alta e baixa capacidade de corrida. Foi realizado um segundo teste de esforço, ao final da quarta semana de treinamento, para o reajuste da velocidade do protocolo utilizado. Por fim, foi realizado um terceiro teste, no final do treinamento, para avaliação da eficácia do protocolo.

Foram utilizados os parâmetros até o último ciclo de três minutos completos do teste de esforço máximo para se estabelecer a velocidade média do treinamento físico, a velocidade máxima e tempo máximo realizado, como também para o cálculo do trabalho desenvolvido durante os testes de esforço máximo e a eficiência mecânica dos animais. O trabalho foi calculado a cada ciclo do teste de esforço máximo, como  $W = [\text{peso corporal (Kg)}] \times [\text{tempo até a fadiga (min)}] \times [\text{velocidade da esteira (m/min)}] \times [\text{seno } \theta \text{ (inclinação da esteira)}]$ .

## Métodos

---

A soma do trabalho produzido em cada ciclo foi usada para comparação entre os grupos. A eficiência mecânica foi calculada como  $EM = [\text{trabalho} \div \text{custo energético}] \times 100$  [114]. O custo energético (CE) foi estimado pela transformação para Kcal do consumo de  $O_2$  durante o teste de esforço máximo, considerando a constante de que cada 1 litro de  $O_2$  consumido equivale ao gasto energético de 5 Kcal.

### **2.3. Protocolo de exercício físico**

Os animais foram submetidos a um protocolo de treinamento gradativo em esteira (Gaustec, Contagem, Brasil), de intensidade baixa-moderada, cinco vezes por semana, durante oito semanas, que consistia de três períodos bem definidos, denominados de pré-corrída, corrida e recuperação. A velocidade e o tempo de cada período foram aumentados a cada dia, até a quarta semana do treinamento (Tabela 2), com base na porcentagem da velocidade máxima obtida por cada animal durante o teste de esforço máximo. Após a quarta semana, a velocidade máxima e a planilha foram ajustadas aos valores obtidos no segundo teste de esforço máximo [113].

### **2.2. Avaliação do consumo de oxigênio ( $O_2$ )**

Após o final das oito semanas de treinamento, foi avaliado o consumo de oxigênio dos animais dos grupos experimentais. Cada animal, individualmente, foi colocado em uma esteira motorizada (Esteira Control HARVARD modelo LE8710) modular, com uma câmara hermeticamente fechada. O consumo de oxigênio foi medido usando um calorímetro indireto de fluxo aberto (LE 405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Espanha) calibrado antes do uso, com mistura certificada de gases (20,5%  $O_2$  e 0,5%  $CO_2$ ). O  $VO_2$  (mL  $O_2$ / Kg /min) foi registrado continuamente, minuto a minuto, por meio de um sistema de aquisição de dados (Metabolism V 2.201, Harvard Apparatus, Espanha). Os animais permaneceram em repouso durante pelo menos 30 minutos, até que os valores



## Métodos

de consumo de O<sub>2</sub> tornassem estáveis para posterior aquisição dos valores basais e durante o teste de esforço [115].

Tabela 2 - Protocolo de Treinamento

Semana 1	Frequência (dias)	Duração	Intensidade - duração				
			Pré-corrída	Corrida	Recuperação		
1		25'		15% (10')	35%(10')	15% (5')	
2		30'	15% (5')	25% (5')	45%(10')	25% (5')	15% (5')
3		35'	20% (5')	30% (5')	45%(15')	30%(5')	20% (5')
4		35'	20% (5')	30% (5')	45%(15')	30%(5')	20% (5')
5		40'	25% (5')	35% (5')	55%(20')	35% (5')	25% (5')
<b>Semana 2</b>							
1		35'	20% (5')	30% (5')	55%(15')	30%(5')	20% (5')
2		40'	25% (5')	35% (5')	60%(20')	35% (5')	25% (5')
3		45'	30% (5')	45% (5')	60%(25')	45% (5')	30% (5')
4		45'	30% (5')	45% (5')	60%(25')	45% (5')	30% (5')
5		50'	30% (5')	45% (5')	60%(30')	45% (5')	30% (5')
<b>Semana 3</b>							
1		50'	30% (5')	45% (5')	60%(30')	45% (5')	30% (5')
2		55'	30% (5')	45% (5')	60%(35')	45% (5')	30% (5')
3		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')
4		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')
5		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')
<b>Semana 4</b>							
1		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')
2		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')
3		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')
4		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')
5		60'	30% (5')	45% (5')	60%(40')	45% (5')	30% (5')

Após o período basal, iniciou-se o teste de esforço dos animais, com velocidade inicial de 6 metros/minuto, com incremento na velocidade de 3 metros/minuto a cada 3 minutos, com inclinação de 5° da esteira. Esse teste foi realizado para aquisição dos valores de consumo de O<sub>2</sub> dos animais durante o teste de esforço máximo até a fadiga. A fadiga foi definida como o ponto no qual os animais não eram capazes de manter o ritmo da corrida.

## Métodos

---

### 3. Parâmetros analisados e tecidos e órgãos coletados

Foram avaliados, semanalmente, durante as oito semanas de alimentação com a dieta hiperglicídica, o consumo de ração e o ganho de peso. Após as oito semanas de tratamento, os animais foram eutanaziados por decapitação e tiveram os seguintes tecidos e órgãos coletados:

- Sangue: foi centrifugado para obtenção do soro e dosagem de glicose, triglicérides, colesterol, insulina, leptina e citocinas.
- Tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal, epididimal, para pesagem e para dosagem de citocinas.
- Tecido adiposo subescapular e periaórtico para pesagem.
- Artéria aorta e mesentérica, para avaliação da reatividade vascular, da expressão proteica, da produção de óxido nítrico e para análise de morfometria utilizando coloração de eosina hematoxilina.

### 4. Análise de parâmetros metabólicos e inflamatórios

A avaliação do aumento da massa dos tecidos adiposos dos animais foi realizada utilizando-se a relação entre os pesos dos diferentes depósitos de gordura e o peso corporal (peso do tecido adiposo por 100 g de peso corporal).

No soro dos animais foram dosados parâmetros metabólicos como triglicérides, glicose, colesterol total e colesterol HDL, por kits enzimáticos colorimétricos (DOLES®). O colesterol LDL e VLDL foram estimados pela equação de Friedewald [116]. Foram avaliadas as concentrações séricas de leptina e insulina, por kits de radioimunoensaio (Millipore®). Os seguintes marcadores inflamatórios foram dosados local (depósitos de tecido adiposo) e sistemicamente (soro) por Kit comerciais para E.L.I.S.A. (R&D System®): fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1).

## Métodos

---

O teste de tolerância oral à glicose foi realizado após 6 h de jejum dos animais no final das 8 semanas de tratamento. Amostra de sangue foi obtida da veia caudal nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração por gavagem de 2 g/kg de glicose em solução aquosa. A dosagem de glicose foi realizada por glicosímetro capilar (ACCU-CHEK®).

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado nos camundongos alimentados. Após a administração intraperitoneal de insulina (Humulin R, Lilly®), na dose 0,75 unidades/Kg de peso corporal, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal, nos tempos 0,15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos para dosagem da concentração de glicose sanguínea. A dosagem de glicose foi realizada por glicosímetro capilar (ACCU-CHEK®)

### **5. Avaliação da pressão sistólica e frequência cardíaca**

A pressão sistólica e a frequência cardíaca foram aferidas pelo método não invasivo de pletismografia de cauda [117]. Antes do início dos protocolos, os animais passaram por um período de 5 dias consecutivos de adaptação ao contensor, no qual os animais foram mantidos durante a aferição da pressão arterial. Os procedimentos foram realizados em local isolado, com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), com a mínima interferência de ruídos externos. Os dados foram registrados por um pletismógrafo (RTBP 2000, Kent Scientific®) conectado a um computador com o programa Windaq para aquisição e avaliação dos dados.

### **6. Avaliação da função vascular**

#### **6.2. Obtenção e montagem dos anéis de aorta**

Após o sacrifício dos animais, a aorta torácica foi retirada, cuidadosamente, e transferida para uma placa de Petri com solução nutritiva de *Krebs-Henseleit* (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5

## Métodos

---

mM; glicose 11 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2 mM; Merck® Alemanha), onde foi removido o excesso de tecido adiposo e conjuntivo [67]. A artéria foi cortada em anéis de 2-3 mm de comprimento. Duas hastes metálicas triangulares foram passadas pelo lúmen do vaso. Os anéis foram transferidos para cubas de vidro com volume de 10 mL, contendo solução de *Krebs-Henseleit*, areada continuamente com carbogênio (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ), a uma temperatura de  $37 \pm 1$  °C. Uma das hastes foi presa à parede da cuba, e a outra foi acoplada a um transdutor de tensão isométrica. Foi dada uma tensão basal de 0,5 g aos anéis, simulando a tensão à qual ele era submetido fisiologicamente. O registro das tensões foi feito através de transdutores isométricos (World Precision Instruments, Inc., USA), acoplados a um amplificador (Modelo TBM-4; World Precision Instruments, Inc., USA), e este conectado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital (AD16JR; World Precision Instruments, Inc.USA). Utilizamos o programa Windaq (Datacq, Inc., USA) para aquisição e análise dos dados experimentais.

### 6.3. Obtenção e montagem dos anéis da artéria mesentérica

O leito arterial mesentérico foi removido e porções da segunda ramificação da artéria mesentérica superior, com diâmetro interno entre 150 e 200  $\mu\text{m}$ , foram dissecadas. Todo o tecido conectivo e adiposo foi removido e anéis de ~2,0 mm foram obtidos [118]. Estes segmentos foram montados em um miógrafo do tipo Mulvani através de fios de tungstênio (20  $\mu\text{m}$  de diâmetro) transpassados pelo lúmen dos vasos. Os vasos foram mantidos em solução de PSS ( $\text{NaCl}$  119 mM;  $\text{KCl}$  4,7 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 mM;  $\text{NaHCO}_3$  14,9 mM;  $\text{MgSO}_4$  1,17 mM;  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM; glucose 5,5 mM), aquecida a 37°C e aerada constantemente, sob uma tensão de repouso de 0,2 g. A atividade mecânica foi medida isometricamente através de um transdutor de força (Fort-10, World Precision Instruments).

### **6.4. Avaliação da integridade dos anéis aórticos e mesentéricos**

A presença de endotélio funcional foi avaliada pelo estímulo com acetilcolina (10  $\mu$ M). Os vasos que relaxaram mais de 80% em relação à pré-contracção induzida pela fenilefrina (100 $\mu$ M) foram considerados como contendo endotélio funcional. Esse critério não foi utilizado para a preparação da artéria mesentérica dos animais obesos, visto que eles apresentaram disfunção da resposta vasodilatadora à acetilcolina. Quando necessário, o endotélio foi removido mecanicamente. A ausência de resposta à acetilcolina foi tida como evidência de que o endotélio foi completamente removido.

### **6.5. Avaliação da resposta e dos mecanismos envolvidos nas alterações vasculares**

Foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (1 nM a 100  $\mu$ M) e à fenilefrina (1 nM a 100  $\mu$ M), para avaliar, respectivamente, a resposta vasorelaxante ou vasoconstritora dos animais dos grupos experimentais. Ferramentas farmacológicas foram empregadas para avaliar o mecanismo de ação das alterações provenientes do tratamento. Para avaliação da participação da via das NOS, foram utilizados inibidores não seletivos (L-NAME, 300  $\mu$ M) e seletivos para as isoformas, eNOS e nNOS (L-NNA 1  $\mu$ M) e iNOS (L-NIL 10  $\mu$ M). Foi avaliada também a participação de prostaglandinas nessas alterações, utilizando-se o inibidor não-seletivo para ciclooxigenase (ibuprofeno, 10  $\mu$ M), o antagonista do receptor TP (SQ29548, 10  $\mu$ M) e o inibidor preferencial da isoforma 2 da ciclooxigenase (celecoxibe, 10  $\mu$ M).

### **6.6. Avaliação da participação da isoforma induzida da NOS (iNOS) nas alterações vasculares**

- **Silenciamento *in vivo* da iNOS**

Para silenciar a isoforma da iNOS, nós utilizamos a técnica de oligodeoxinucleotídeos antisense (AS-ODNs) fosfosulfatados, construído com 21 bases na sequência complementar para a iNOS do camundongo. Foi utilizada a sequência: 5'-CAG UGU AUA AUU CCU UGA UTT-3' para iNOS (Genbank NM 010927). A sequência de AS-ODN foi obtida da Eurogentech North America Inc (San Diego, CA, USA). Foi utilizada como controle uma sequência similar à sequência anteriormente descrita, porém ineficaz para interferir na síntese proteica da iNOS, denominada *mismatch* ODN (MM-ODN), com a seguinte composição: 5'-GTC TTG AAC TTC CCG ATC T-3'. Oito animais de cada um dos dois grupos sedentários, SC e SD, receberam 2 nmol de AS-ODN ou 2 nmol de MM-ODN (controle negativo) através da veia peniana, 12 horas antes dos experimentos conforme descrito pelo nosso grupo [67]. A eficiência do AS-ODN em bloquear a expressão e a ação da iNOS foi avaliada por Western blot e por ensaios funcionais.

- **Animais com deleção gênica da iNOS (Animais iNOS<sup>-/-</sup>)**

Foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina (1 nM a 1 mM) para avaliar a resposta vasoconstritora dos animais iNOS<sup>-/-</sup> tratados por oito semanas com a ração controle ou com a dieta hiperglicídica.

### **7. Determinação da expressão proteica da iNOS, eNOS, COX-2, subunidade p65 do NFκB e receptor-1 do TNFα por Western blot.**

A aorta e artéria mesentérica foram congeladas a -80°C e, posteriormente, homogeneizadas com um homogeneizador de tecidos tipo turrax (Marconi®, Brasil) em presença de tampão de lise (NaCl 150 mM; Tris 50 mM; EDTA 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM) acrescido de 0,3 % de Triton X-100, 0,5% de SDS e de coquetel de inibidores de proteases (SigmaFast®, Sigma). Após o processamento, as

## Métodos

---

amostras foram centrifugadas a 3600 G por 8 minutos. A quantidade de proteínas das amostras foi mensurada de acordo com o método de Bradford [119]. As amostras foram diluídas em tampão da amostra (4X tris HCl/SDS pH=6,8, 3% Glicerol, 1% SDS, 0,6%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) e aquecidas a 98 °C por 5 minutos. Para separação, foram aplicados 30 $\mu$ g de proteína em gel de 10% SDS-PAGE. Após serem separadas no gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®, USA) com poro de 0,45 $\mu$ m. Após o bloqueio (2h em TBS-Tween 0,1% mais 3% de albumina), a membrana foi incubada *overnight* em câmara fria (6-8 °C), com o anticorpo primário específico diluído em 1,5% de albumina em TBS-Tween 0,1%. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-iNOS (monoclonal feito em camundongo; diluição de 1:2000), anti-eNOS (monoclonal feito em camundongo; diluição de 1:2000), anti-p65-NF $\kappa$ B (policlonal feito em coelho; diluição de 1:500) e anti-COX-2 (policlonal feito em camundongo; diluição de 1:500), anti-receptor-1 para TNF $\alpha$  (monoclonal feito em camundongo; diluição de 1:2000) e anti $\beta$ -actina (monoclonal feito em camundongo; diluição de 1:3000). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS contendo 0,3% de Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos (por três vezes) e incubada por duas horas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP), anti-IgG de camundongo (diluição de 1:15000 em TBS-Tween com 2% de albumina) ou anti-IgG de coelho (diluição de 1:20000 em TBS-Tween com 2% de albumina). Após o período de incubação, a membrana foi novamente lavada em TBS-T (5 minutos por três vezes). As bandas proteicas foram detectadas por uma reação de quimiluminescência (*kit* ECL plus – Amersham Biosciences do Brasil Ltda) e a intensidade das mesmas foi avaliada por análise densitométrica através do software ImageJ 1.48.

### **8. Dosagem da produção basal de NO**

#### **8.1. Dosagem de nitrito por fluorimetria utilizando o DAN**

O método utilizado para dosagem da produção basal de óxido nítrico foi o método de detecção fluorimétrica do 1-(H)-naphthotriazole, um produto fluorimétrico da reação entre o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ , metabólito comum do NO) e o 2,3-diaminonaftaleno (DAN). O ensaio com o DAN foi realizado de acordo com Misko e colaboradores com pequenas modificações [120]. Os anéis de aorta foram acondicionados em solução de Krebs, a  $37^\circ\text{C}$ , em estufa com atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Depois desse período, amostra do persufato foi coletada para dosagem da produção de nitrito basal. Cada anel foi utilizado como controle de si mesmo, uma vez que, após a coleta do perfusato para dosagem da produção basal, os vasos foram incubados com L-NAME ( $300 \mu\text{M}$ ) por 20 minutos para avaliar a participação da óxido nítrico sintase nessa produção. Para reação,  $100 \mu\text{L}$  de perfusato foi imediatamente misturado a  $10 \mu\text{L}$  da solução estoque de DAN ( $0,05 \text{ mg/mL}$  em HCl  $0,62 \text{ M}$ ) em poços de microplacas, de 96 poços, pretas e opacas (Costar®, USA). A reação se processou por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, a reação foi paralisada com  $5 \mu\text{L}$  de NaOH ( $2,8 \text{ M}$ ) e a placa foi lida em um espectrofluorímetro (excitação  $365 \text{ nm}$ , emissão  $440 \text{ nm}$ ; Cary Eclipse Microplatereader, VARIAN, Inc.). A concentração de  $\text{NO}_2^-$  nas amostras foi calculada com base em uma curva padrão, com concentrações predeterminadas de  $\text{NO}_2^-$ , a cada experimento e normalizada pelo peso seco do anel de aorta.

#### **8.2. Determinação da síntese de NO por microscopia de epifluorescência**

A confirmação da síntese basal de NO em cortes de aorta foi realizada em microscopia de epifluorescência, modificado de Davel e colaboradores [121]. A aorta foi embebida em meio de criopreservação (TissueTek®), e cortes



## Métodos

---

transversos de 5  $\mu\text{m}$  foram obtidos com criostato. Os cortes foram estabilizados em tampão fosfato (PBS 0,1 mM, pH = 7,4) contendo  $\text{CaCl}_2$  (0,45 mM) por 10 minutos a 37°C. Após esse período, os cortes foram incubados com a sonda intracelular fluorescente para o NO, 4-amino,5-metilamino-2',7'-difluoresceína diacetato (DAF-FM DA), na concentração de 8  $\mu\text{M}$  por 30 minutos, protegidos da luz. Imagens digitais foram obtidas na objetiva de 20x, usando o microscópio de fluorescência NIKON ECLIPSE Ti do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas no programa Image J 1.48, usando a função de análise de densidade óptica de fluorescência da área de interesse (ROI manager). Quinze áreas de interesse foram selecionadas em cada corte analisado. Cinco cortes de cada animal foram analisados. Um número amostral de três animais por grupo experimental foi utilizado.

### **9. Análise histológica da aorta**

Após o sacrifício dos animais, uma porção da aorta torácica foi removida e fixada em ácido pícrico (Bouin), por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, os tecidos foram desidratados através de lavagem seqüencial com etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% e etanol 100%, e incluídos em parafina (Paraplast®X-tra Tissue Embedding Medium, McCormick Scientific). Foram preparadas lâminas contendo em média 10 cortes transversais de 6  $\mu\text{m}$ , por animal. As preparações foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E), codificadas e submetidas à análise microscópica. Imagens digitais, na objetiva de 20x de aumento, foram obtidas usando o Scanner de lâminas - 3D Histech, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG. As imagens foram analisadas usando o programa PannoramicViewer. Dados como número de núcleos por área selecionada, espessura da parede vascular (do endotélio à adventícia), área vascular total e área do lúmen vascular foram coletados. A área da parede vascular foi estimada pela subtração da área do lúmen da área vascular total. Esse parâmetro foi usado para o cálculo da razão área da parede vascular pela área do lúmen.

### 10. Análise estatística

Os cálculos e análises estatísticos foram realizados utilizando-se o programa GraphPadPrism 4.0. As curvas concentração-resposta cumulativas à fenilefrina foram expressas pela razão força por comprimento do anel (mN/mm). Os dados de relaxamento vascular foram representados como o percentual de redução da contração em resposta à fenilefrina. Ambas as curvas foram analisadas ponto-a-ponto através do método Two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo BONFERRONI. Os valores de Emax foram determinados através de regressão não-linear das curvas concentração-resposta obtidas nos experimentos, representando a resposta máxima à fenilefrina (para as curvas de contração) ou à acetilcolina (para as curvas de relaxamento). Os dados de Western blot foram expressos como média  $\pm$  EPM dos valores obtidos para cada amostra, normalizados pelos resultados de  $\beta$ -actina de cada amostra. As imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência por área. Os resultados expressos por gráficos de barras foram comparados pelos testes t de Student ou pelo método One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, após a avaliação da normalidade da distribuição dos dados. O teste de normalidade utilizado foi o teste Kolmogorov-Smirnov. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

# *Resultados*

# Resultados

---

## Resultados

### **1 - Padronização do modelo de obesidade em camundongos e avaliação do efeito do treinamento físico:**

#### **1.1- Ganho de peso dos animais e depósitos de tecido adiposo retroperitoneal, mesentérico, epididimal e periaórtico;**

Realizamos a padronização do modelo de obesidade induzida por dieta hiperglicídica, enriquecida com leite condensado e açúcar, em camundongos. Em resposta ao tratamento com dieta, os animais obesos sedentários apresentaram alterações corporais, como o aumento de ganho de peso corporal ( $SC = 4,48 \pm 0,34$ ;  $SD = 6,61 \pm 0,85g$ ;  $p < 0,05$ ) e dos depósitos de gordura analisados: aumento de 65,8% do depósito de gordura mesentérico, de 81% do epididimal, de 146,1% do retroperitoneal e de 173,3% do tecido adiposo periaórtico, quando comparados com os respectivos depósitos de tecido adiposo do grupo SC. Os animais obesos também apresentaram uma maior ingestão calórica. O treinamento físico atenuou o aumento dos depósitos de gordura epididimal e retroperitoneal e normalizou a ingestão calórica, o ganho de peso corporal e peso dos depósitos de gordura mesentérico, periaórtico e marrom. Não foram encontradas diferenças significativas na pressão arterial sistólica e na frequência cardíaca entre os grupos (tabela 3).

## Resultados

Tabela 3 - Parâmetros corporais e energia ingerida em animais tratados com dieta hiperglicídica e treinamento físico. Símbolos representam a análise estatística entre os grupos: \*SC x SD; §SC x EC; &SD x ED; #EC x ED. Teste t-Student. O nível-p foi representado pelo número de repetições dos símbolos, por exemplo, \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. N= 18 animais.

Parâmetros	SC	SD	EC	ED
Peso corporal inicial (g)	26,78 ± 0,29	26,99 ± 0,45	26,90 ± 0,62	26,13 ± 0,68
Peso corporal final (g)	31,26 ± 0,37	33,01 ± 0,67*	29,83 ± 0,71	29,22 ± 0,86 <sup>&amp;&amp;</sup>
Ganho de peso final (g)	4,48 ± 0,34	6,61 ± 0,85*	3,85 ± 0,96	3,55 ± 0,97 <sup>&amp;</sup>
Energia ingerida (Kcal/dia)	12,40 ± 0,67	18,59 ± 0,87***	12,70 ± 0,66	15,15 ± 1,25 <sup>&amp;</sup>
Gordura epididimal (g) / peso corporal (g) x 1000	6,07 ± 0,46	11,01 ± 0,64***	5,43 ± 0,25	8,83 ± 0,74 <sup>&amp;##</sup>
Gordura mesentérica (g) / peso corporal (g) x 1000	8,32 ± 0,91	14,61 ± 0,83***	8,31 ± 0,99	11,22 ± 0,87 <sup>&amp;</sup>
Gordura retroperitoneal (g) / peso corporal (g) x 1000	1,71 ± 0,19	4,21 ± 0,23***	1,60 ± 0,17	3,04 ± 0,34 <sup>&amp;&amp;###</sup>
Gordura subescapular (g) / peso corporal (g) x 1000	3,47 ± 0,15	5,00 ± 0,26**	3,93 ± 0,32	4,22 ± 0,21 <sup>&amp;</sup>
Gordura periaórtica (g) / peso corporal (g) x 1000	0,15± 0,03	0,41± 0,06*	0,21 ± 0,04	0,34 ± 0,06
Pressão arterial sistólica (mmHg)	98,32 ± 3,19	94,45 ± 2,55	100,9 ± 4,31	96,28 ± 3,24
Frequência Cardíaca (bpm)	608,4 ± 32,83	613,5 ± 19,27	585,8 ± 1,75	594,2 ± 48,87

### 1.2- Níveis séricos de glicose, triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, insulina e leptina.

Em relação às alterações metabólicas e hormonais, verificamos que os animais obesos apresentaram um aumento nos níveis séricos de LDL (94% de aumento), de colesterol total (60% de aumento) e da relação LDL/HDL (82% de aumento). As concentrações séricas de insulina (60% de aumento) e leptina (74% de aumento) também estavam elevadas nos animais obesos sedentários. O treinamento físico preveniu o aumento das concentrações séricas de cLDL (SD = 63,34 ± 7,46; ED = 47,94 ± 6,55 mg.dL<sup>-1</sup>, p<0,05), leptina (SD = 2,96 ± 0,29; ED = 1,34 ± 0,24 ng/mL, p<0,05), insulina (SD = 0,82 ± 0,10; ED = 0,49 ± 0,12 ng/mL, p<0,05) e o aumento na razão cLDL/cHDL. O treinamento físico atenuou o aumento das concentrações de colesterol total. Não foram encontradas diferenças nas concentrações séricas de glicose, triglicérides,

## Resultados

ácidos graxos livres e VLDL, bem como, não houve diferença na concentração de lipídios hepáticos entre os grupos experimentais. Os animais do grupo EC apresentaram uma menor concentração de cHDL (redução de 30,14%) quando comparado ao grupo SC. Já os animais treinados tratados com a dieta não apresentaram alteração da concentração de cHDL quando comparados com os animais obesos sedentários, mas apresentaram um aumento de 84,4 % quando comparados ao grupo EC, tabela 4.

**Tabela 4 - Parâmetros metabólicos e hormonais séricos em animais tratados com dieta hiperglicídica e treinamento físico. Símbolos representam a análise estatística entre os grupos: \*SC x SD; <sup>§</sup>SC x EC; <sup>&</sup>SD x ED; <sup>#</sup>EC x ED. Teste t-Student. O nível-p foi representado pelo número de repetições dos símbolos, por exemplo, \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. N=7 animais.**

Parâmetros	SC	SD	EC	ED
Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )	200,3 ± 16,85	228,8 ± 24,48	181,7 ± 18,21	213,7 ± 21,11
Triglicérides (mg.dL <sup>-1</sup> )	99,33 ± 14,25	84,02 ± 9,23	92,93 ± 20,52	78,25 ± 11,71
Ácidos Graxos Livres (mM.L <sup>-1</sup> )	1,49 ± 0,08	1,80 ± 0,18	1,81 ± 0,21	1,78 ± 0,17
Lípides hepáticos (mg/100mg de tecido)	3,96 ± 0,15	4,32 ± 0,19	4,02 ± 0,35	2,93 ± 0,65
Colesterol total (mg.dL <sup>-1</sup> )	77,45 ± 6,02	124,0 ± 8,01 <sup>***</sup>	68,68 ± 6,88	97,96 ± 8,67 <sup>#&amp;</sup>
VLDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	20,86 ± 2,93	16,80 ± 1,85	18,59 ± 4,10	15,65 ± 2,34
cLDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	32,62 ± 6,27	63,34 ± 7,46 <sup>**</sup>	32,73 ± 4,51	47,94 ± 6,55 <sup>&amp;</sup>
cHDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	27,47 ± 2,68	33,78 ± 3,71	19,19 ± 2,69 <sup>§</sup>	35,40 ± 4,67 <sup>#</sup>
cLDL/cHDL	1,135 ± 0,21	2,07 ± 0,32 <sup>*</sup>	1,79 ± 0,23	1,52 ± 0,23 <sup>&amp;</sup>
Leptina (ng/mL)	1,70 ± 0,21	2,96 ± 0,29 <sup>**</sup>	1,49 ± 0,13	1,34 ± 0,24 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
Insulina (ng/mL)	0,51 ± 0,05	0,82 ± 0,10 <sup>*</sup>	0,46 ± 0,08	0,49 ± 0,12 <sup>&amp;</sup>

## Resultados

### 1.3- Avaliação da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina nos animais dos quatro grupos experimentais.

Os animais não mostraram alteração da curva de tolerância à glicose, figura 6. No entanto, o teste de sensibilidade à insulina mostrou uma maior sensibilidade à insulina nos animais do grupo EC, quando comparados ao grupo SC, (figura 7).

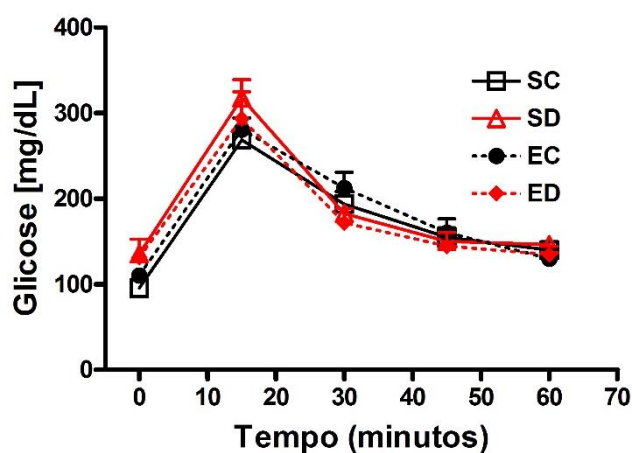


Figura 6 - Perfil de glicose sérica durante o teste de tolerância à glicose. Não houve diferença entre os grupos. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=5. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

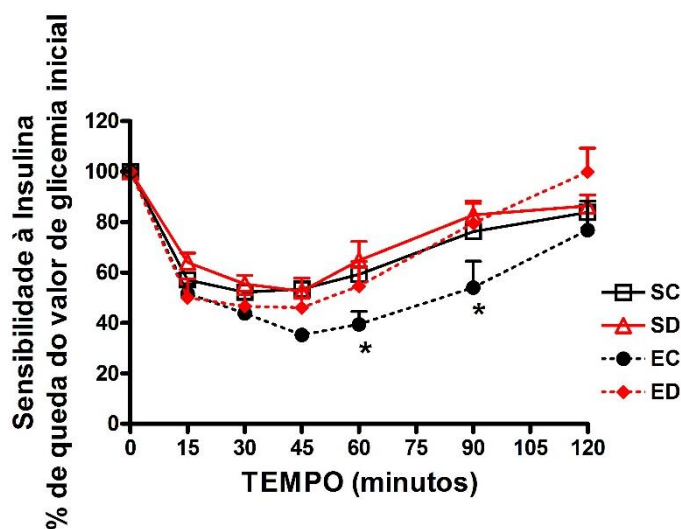


Figura 7 - Perfil da glicose sérica durante o teste de sensibilidade à glicose. O treinamento físico melhorou a sensibilidade à insulina no grupo controle. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=5. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  entre SCx EC.

# Resultados

## 2 –Treinamento físico dos animais

Os animais treinados obtiveram um desempenho físico maior, observado pelo aumento do trabalho (figura 8.A, tabela 5) e da velocidade máxima (figura 8.B, tabela 5) produzida durante os testes de esforço máximo, quando comparados aos respectivos grupos sedentários. A dieta não diminuiu o desempenho dos animais treinados durante os testes.

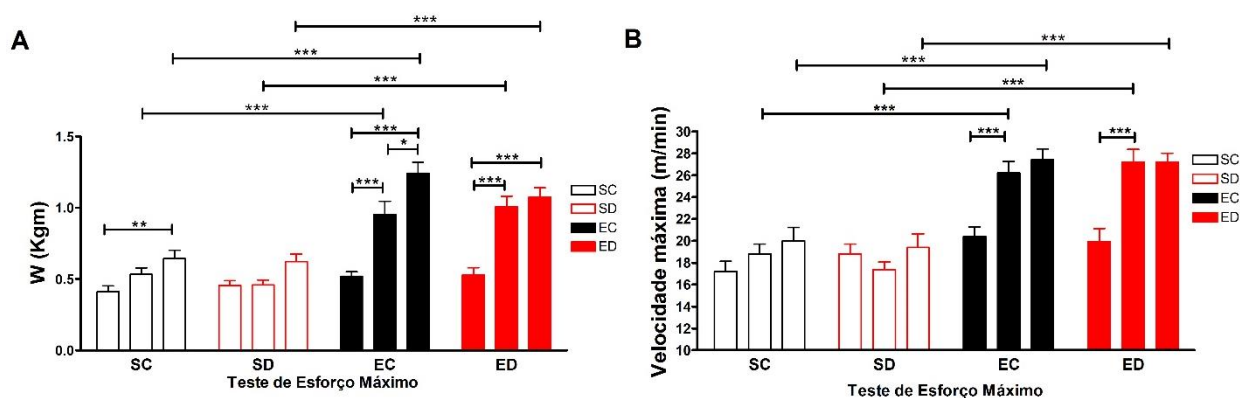


Figura 8 – Trabalho e Velocidade máxima desenvolvida durante os três testes de esforço máximo. Cada barra representa o trabalho (A) e a velocidade máxima (B) desenvolvido pelo grupo durante cada um dos testes de esforço, em ordem cronológica. Dados representados em média  $\pm$  EPM. N=15 animais \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Tabela 5 - Desempenho dos animais durante o teste de esforço máximo. Dados representam médias  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  teste t-Student. N= 15 animais. Diferença em relação ao primeiro teste de esforço máximo.

PARÂMETROS	Teste de Esforço máximo	SC	SD	EC	ED
Velocidade máxima (m/min)	1º	17,20 $\pm$ 0,95	18,80 $\pm$ 0,90	20,40 $\pm$ 0,89	20,40 $\pm$ 1,21
	2º	18,80 $\pm$ 0,90*	17,40 $\pm$ 0,67	26,20 $\pm$ 1,07 ***	27,21 $\pm$ 1,15***
	3º	20,00 $\pm$ 1,23 *	19,40 $\pm$ 1,23	27,43 $\pm$ 0,98 ***	27,21 $\pm$ 0,79***
Trabalho (Kgm)	1º	0,41 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,05
	2º	0,53 $\pm$ 0,05 *	0,46 $\pm$ 0,03	0,95 $\pm$ 0,09***	1,00 $\pm$ 0,08***
	3º	0,64 $\pm$ 0,06 *	0,62 $\pm$ 0,05	1,18 $\pm$ 0,09 ***	1,08 $\pm$ 0,06***



## Resultados

Os animais dos grupos de treinamento apresentaram uma redução de aproximadamente 15% no consumo de O<sub>2</sub> basal, quando comparados aos animais do grupo SD (figura 9.A). Não houve diferença significativa do consumo de oxigênio durante o teste de esforço máximo figura 9.B. No entanto, o consumo de O<sub>2</sub> dos animais treinados foi relativamente menor quando comparados ao consumo de O<sub>2</sub> dos animais sedentários, o que refletiu na maior eficiência mecânica dos animais treinados, figura 10.

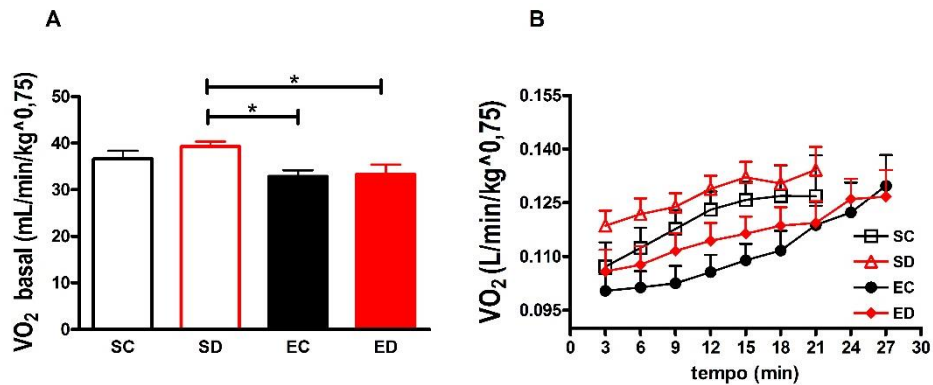


Figura 9 - Consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) dos grupos experimentais no basal e durante o teste de esforço máximo. (A) gráfico da média dos valores de consumo de O<sub>2</sub> dos 15 minutos que antecedem o teste de esforço máximo. (B) Curva de consumo de O<sub>2</sub> durante o teste de esforço máximo após as 8 semanas de treinamento. Dados representam médias  $\pm$  EPM. N=10 animais. \* $p < 0,05$ , One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Os animais treinados mostraram uma maior eficiência mecânica durante o teste de esforço máximo, em relação aos seus respectivos grupos sedentários (SC=18,50 $\pm$ 1,19 x EC=24,21 $\pm$ 0,96,  $p < 0,01$ ; SD=16,86 $\pm$ 0,91 x ED=25,13 $\pm$ 1,52), figura 10.

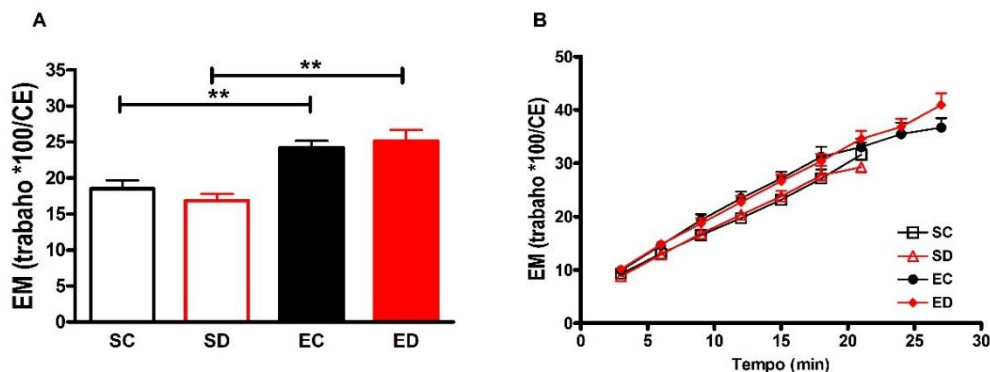


Figura 10 - Eficiência mecânica (EM) dos animais durante o teste de esforço final. (A) média da eficiência mecânica desempenhada durante todo o teste de esforço. (B) Eficiência mecânica a cada ciclo de 3 minutos do teste de esforço máximo. Dados representam médias  $\pm$  EPM. N=10 animais. \*\* $p < 0,01$ , pelo Teste t-Student.

## Resultados

### 3 – Avaliação das alterações funcionais em um modelo de vaso de condutância (aorta) e em um modelo de vaso de resistência (artéria mesentérica).

#### 3.1 - Investigação dos mecanismos envolvidos nas alterações de resposta relaxante

Em relação à aorta, vaso de condutância escolhido, os grupos não apresentaram diferença na resposta vasodilatadora (figura 11).

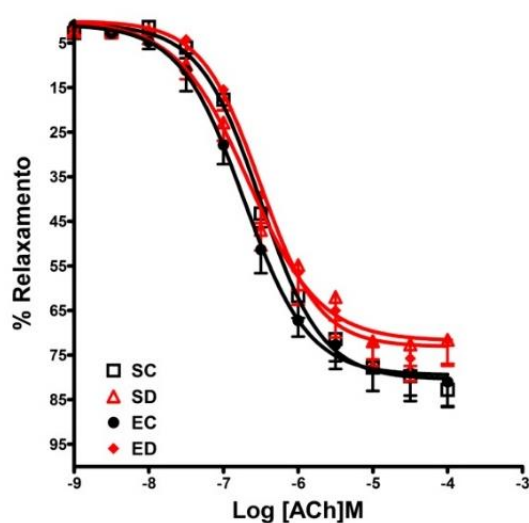


Figura 11 - Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de aorta nos grupos experimentais SC, SD, EC e ED. A resposta vasodilatadora foi semelhante em ambos os grupos. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=7 animais. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni

Em relação à artéria mesentérica, vaso de resistência escolhido, os animais sedentários, que receberam a dieta, apresentaram uma disfunção endotelial, caracterizada por uma menor resposta vasodilatadora à acetilcolina (SC  $E_{max} = 84,96 \pm 3,076$ ; SD  $E_{max} = 61,45 \pm 1,746$  % de relaxamento,  $p < 0,001$ ; figura 13A). A disfunção foi reduzida pelo treinamento físico (ED  $E_{max} = 76,89 \pm 1,728$  % de relaxamento; figura 12).

## Resultados

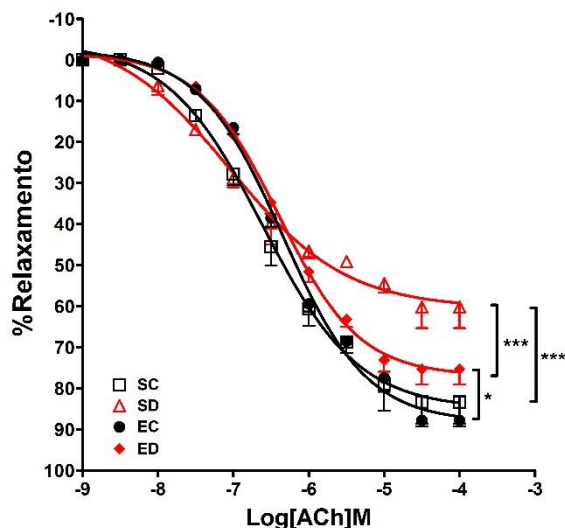


Figura 12 - Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de artéria mesentérica dos grupos SC, SD, EC e ED. O treinamento físico melhorou a resposta vasodilatadora dos animais alimentados com a dieta hiperglicídica. Os dados são representados como média  $\pm$  EPM de N=5 animais. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

### 3.2 – Investigação das alterações de resposta contrátil na aorta

A aorta dos animais tratados com a dieta (sedentários e treinados) apresentou uma severa diminuição da resposta contrátil à fenilefrina (SC  $E_{max} = 4,98 \pm 0,18$  mN/mm versus SD  $E_{max} = 2,49 \pm 0,08$  mN/mm  $p < 0,001$ ; EC  $E_{max} = 4,10 \pm 0,224$  mN/mm versus ED  $E_{max} = 2,42 \pm 0,140$  mN/mm;  $p < 0,001$ ), figura 13.A. A remoção do endotélio normalizou a resposta contrátil dos animais tratados com a dieta hiperglicídica (figura 13.B).

## Resultados

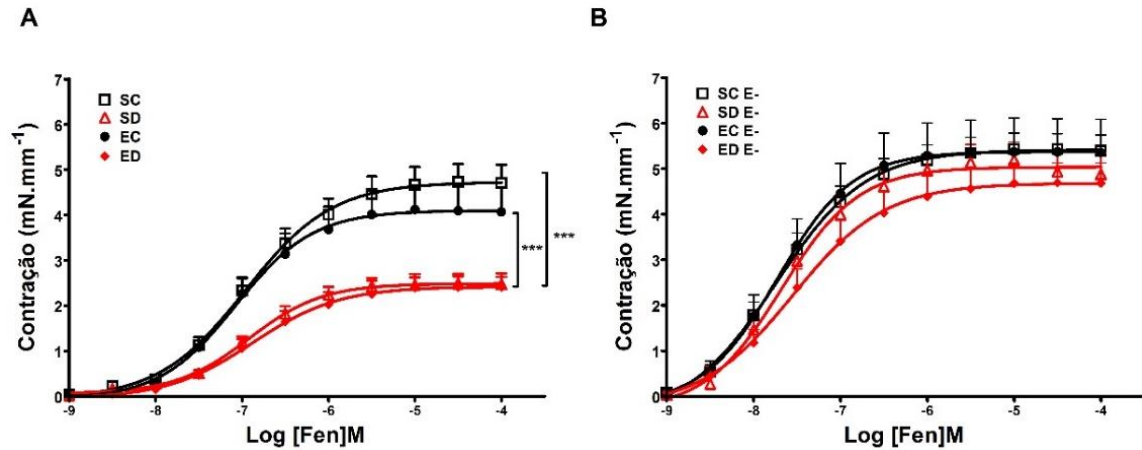


Figura 13 -Avaliação da resposta contrátil de anéis de aorta dos animais SC, SD, EC e ED. (A) na presença e (B) ausência de endotélio funcional. Os animais sedentários e treinados tratados com a dieta hiperglicídica apresentaram uma menor resposta constritora à fenilefrina, que foi normalizada pela remoção do endotélio funcional. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=10 animais. \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

A integridade da maquinaria contrátil foi avaliada pela curva de concentração resposta com KCl, que não mostrou alteração entre os grupos experimentais (figura 14).

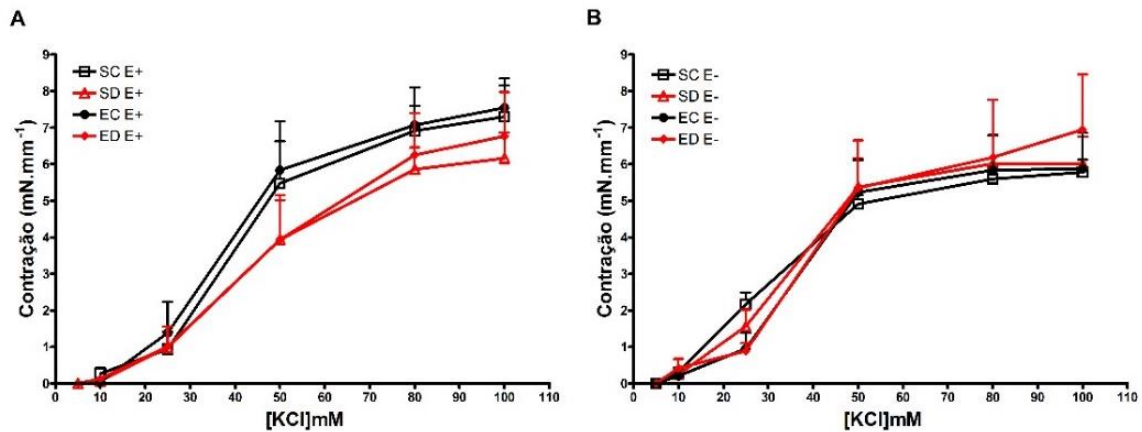


Figura 14 - Avaliação da resposta contrátil de anéis de aorta dos animais SC, SD, EC e ED em resposta ao KCl. (A) na presença e (B) ausência de endotélio funcional. Os animais não apresentaram diferença de resposta contrátil ao KCl. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6 animais. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Para avaliar a participação do NO, um importante fator vasodilatador em vasos de condutância, na menor resposta contrátil dos animais tratados com a dieta hiperglicídica, avaliamos a enzima produtora de NO. Verificamos que a incubação prévia dos anéis de aorta com L-NAME (300 $\mu$ M), um inibidor não-

## Resultados

seletivo das NOS, restaurou a contração dos animais tratados com a dieta (figura 15), sugerindo a participação da via das NOS nessa alteração de resposta contrátil.

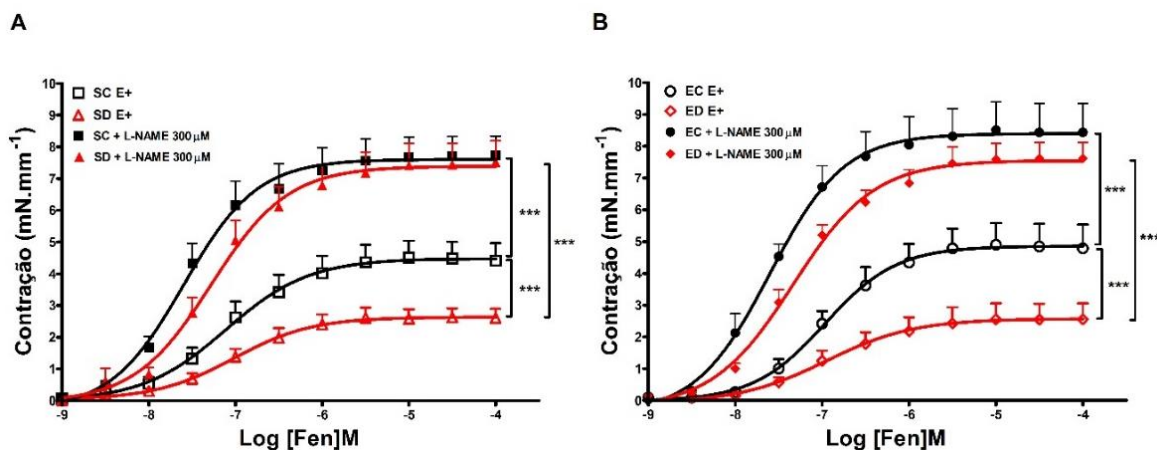


Figura 15 - Avaliação da participação da via das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) na hiporresponsividade aórtica dos animais tratados com a dieta hiperglicídica. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com L-NAME (300 μM), inibidor não-seletivo das NOS, normalizou a resposta contrátil dos animais tratados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média ± EPM de N=6-8 animais. \*\*\*p<0,001, Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Com o intuito de descobrir qual isoforma das NOS era a responsável pela hiporresponsividade aórtica à fenilefrina, utilizamos inibidores seletivos para as isoformas constitutivas e para a isoforma induzida. A inibição das isoformas constitutivas com L-NNA (1 μM) (eNOS e nNOS) não igualou a resposta contrátil dos animais sedentários tratados com a dieta hiperglicídica à resposta dos animais do grupo controle (figura 16.A). Esse resultado sugere que essa isoforma não é a responsável pela alteração da resposta vascular nesses animais. No entanto, a incubação com L-NNA aumentou a contração dos animais ED (figura 16 B), sugerindo que as isoformas constitutivas têm um papel importante da modulação da contração induzida pelo exercício.

## Resultados

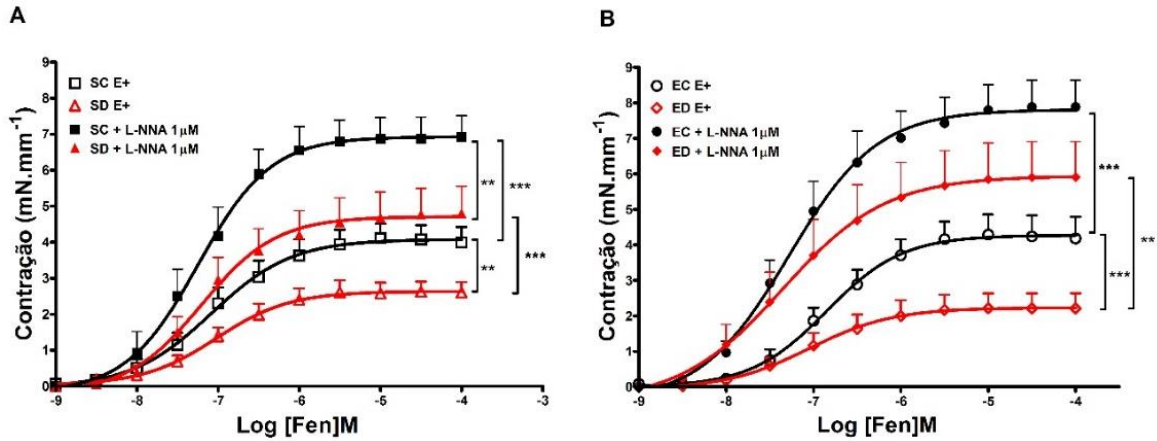


Figura 16- Avaliação da participação das isoformas constitutivas das NOS na menor resposta contrátil dos grupos SD e ED. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com L-NNA (1 $\mu$ M), inibidor preferencial das isoformas endotelial e neuronal da NOS, não normalizou a resposta contrátil dos animais sedentários e reverteu parcialmente a menor resposta dos animais treinados tratados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6 animais. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

O delta da área sob a curva das curvas de contração à fenilefrina na presença e na ausência do L-NNA também sugere uma maior participação das isoformas constitutivas da NOS no controle da resposta contrátil dos animais treinados (figura 17).

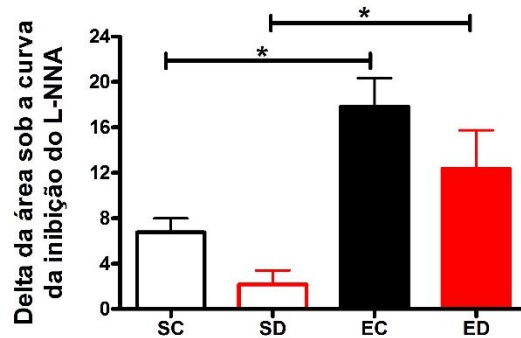


Figura 17 – Efeito inibitório do L-NNA na resposta contrátil à fenilefrina dos animais dos grupos SC, SD, EC e ED. Os valores foram obtidos do delta da área sob à curva entre a curva de contração na presença do inibidor preferencial das isoformas constitutivas da NOS (L-NNA, 1  $\mu$ M) e na ausência desse inibidor. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM N=6. \* $p < 0,05$ . One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

## Resultados

Por outro lado, a inibição da iNOS, com o inibidor seletivo L-NIL (10 $\mu$ M), reverteu a diminuição da resposta contrátil nos animais sedentários (figura 18.A), mas não nos animais treinados alimentados com a dieta hiperglicídica (ED; figura 18.B).

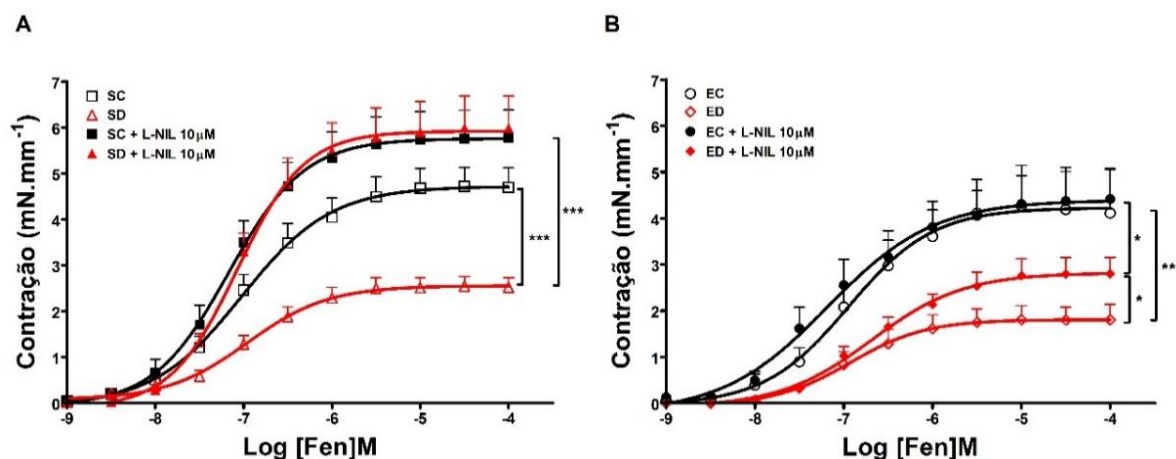


Figura 18 - Avaliação da participação da isoforma induzida da NOS (iNOS) na menor resposta contrátil da aorta dos animais SD e ED. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com L-NIL (10 $\mu$ M), inibidor preferencial da isoformaiNOS, normalizou a resposta contrátil dos animais sedentários e reverteu parcialmente a menor resposta dos animais treinados tratados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=5 animais. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni \* $p$ <0,05 e \*\*\* $p$ <0,001.

Ambos os grupos tratados com a dieta hiperglicídica apresentaram um aumento da expressão da isoforma induzida da NOS (536,4% de aumento, figura 19) e do receptor -1 para TNF $\alpha$  (319,7% de aumento, figura 20). O treinamento físico atenuou esse aumento (iNOS: 226,3%; R-1-TNF $\alpha$ : 71,7%), figura 19 e 20. A expressão da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) não estava alterada na aorta dos grupos alimentados com a dieta hiperglicídica (SD e ED). O treinamento físico aumentou a expressão da eNOS (60,1% de aumento) na aorta do grupo EC, figura 21.

## Resultados

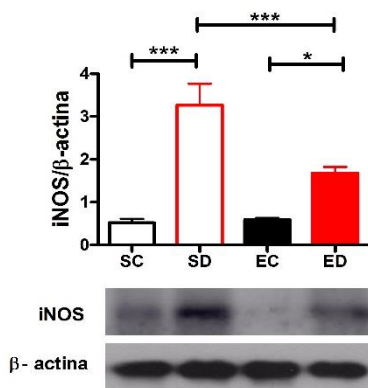


Figura 19 - Avaliação da expressão da iNOS na aorta dos grupos experimentais. O dados são representados como média  $\pm$  EPM de N=7 animais. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

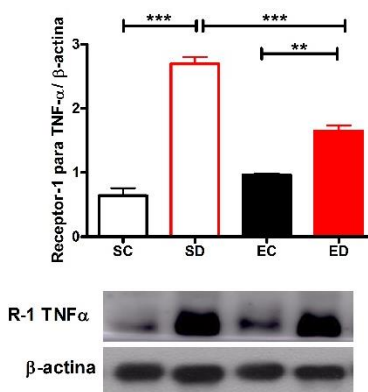


Figura 20 - Avaliação da expressão proteica do receptor-1 para TNFα na aorta dos grupos experimentais. O dados são representados como média  $\pm$  EPM de n=3. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

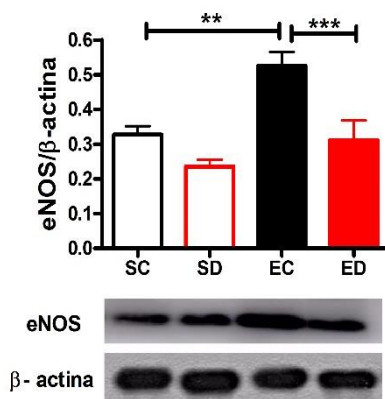


Figura 21 - Avaliação da expressão da eNOS na aorta dos grupos experimentais. O dados são representados como média  $\pm$  EPM de N=5 animais. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey \*\* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .



## Resultados

Os animais nos quais foi induzido o silenciamento agudo da iNOS (figura 22 A) e os animais com deleção gênica para a iNOS (figura 22 B) não apresentaram a redução da resposta contrátil à fenilefrina quando tratados com a dieta hiperglicídica. A qualidade da técnica de silenciamento foi avaliada pela redução da expressão proteica da iNOS na aorta. Doze horas após a aplicação das sequências de AS-ODN para iNOS, a expressão dessa isoforma na aorta foi reduzida em aproximadamente 68%, como mostrado pelos resultados de sua expressão proteica, figura 23.

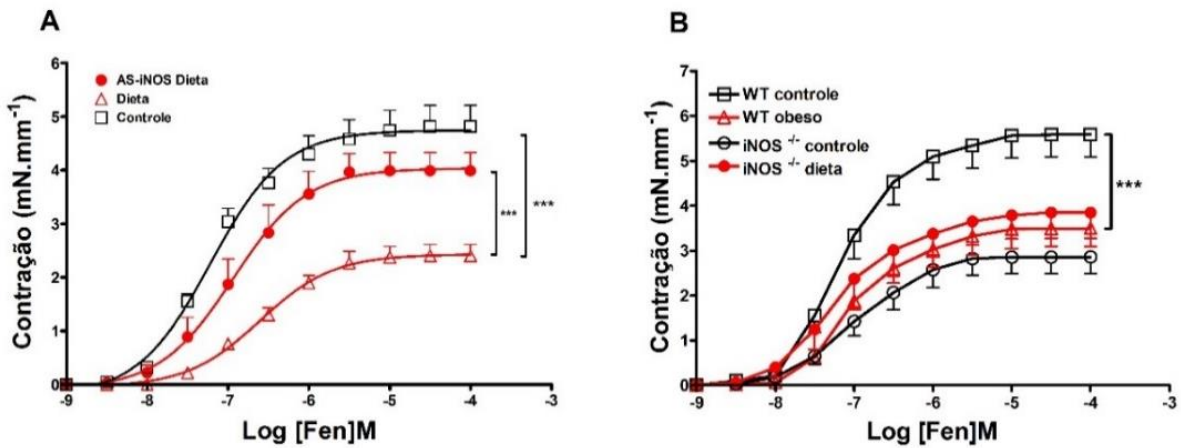


Figura 22 - Avaliação do papel da iNOS na menor resposta contrátil à fenilefrina na aorta dos animais com silenciamento agudo da iNOS e animais com deleção gênica dessa enzima tratados com a dieta hiperglicídica. (A) O silenciamento agudo da iNOS reverteu a menor resposta contrátil à fenilefrina dos animais obesos. (B). Os animais iNOS<sup>-/-</sup> tratados com a dieta não apresentaram hiporresponsividade à fenilefrina. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6 animais. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni \*\*\* $p$ <0,001.

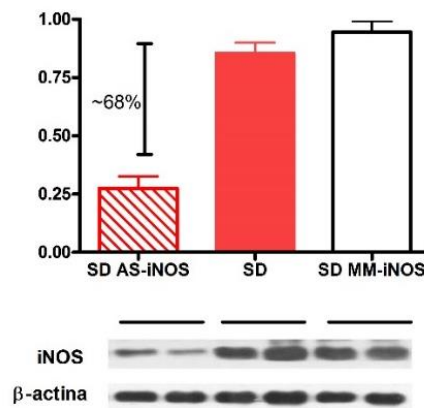


Figura 23 – Avaliação do silenciamento da expressão proteica da iNOS na aorta de camundongos alimentados com a dieta hiperglicídica. SD: sedentário dieta hiperglicídica; SD AS-iNOS: sedentário dieta hiperglicídica tratados com sequência antisense para iNOS; SD MM-iNOS: sedentário dieta hiperglicídica tratados com a sequência *mismatch* para iNOS. N=4 animais.

## Resultados

A produção basal de NO na aorta dos animais do grupo SD (161,1 % de aumento) e ED (72% de aumento), se mostrou aumentada (figura 24) quando dosado pelo método de DAN. Esses dados foram corroborados pelos experimentos de microscopia de fluorescência com DAF que também mostraram um aumento de NO nos animais que receberam a dieta (figura 25).

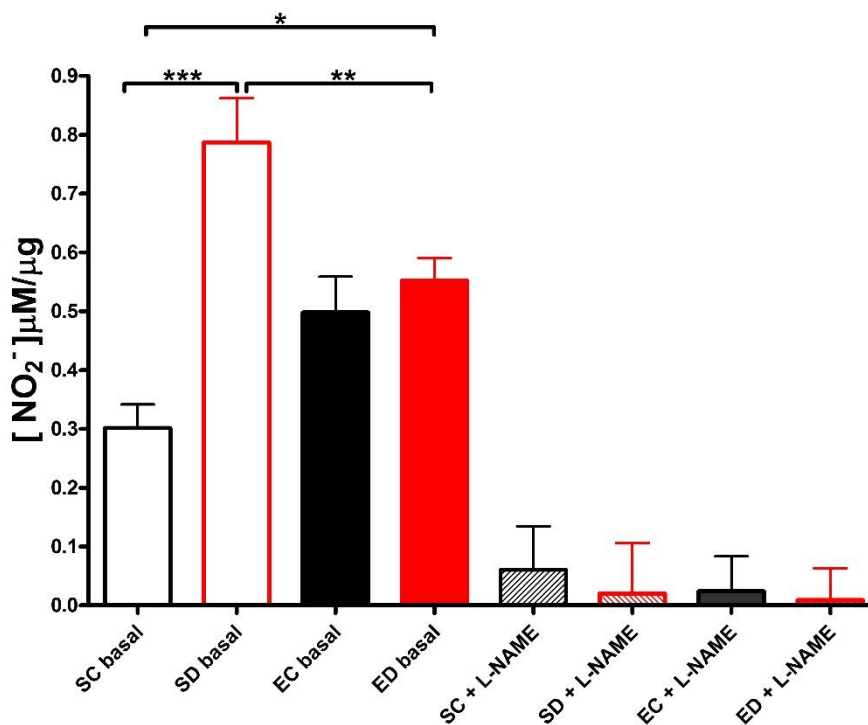


Figura 24 - Dosagem indireta da produção basal de NO pelo método do diaminonaftaleno (DAN) em anéis de aorta dos grupos experimentais. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM. N=6. Teste t-Student, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

## Resultados

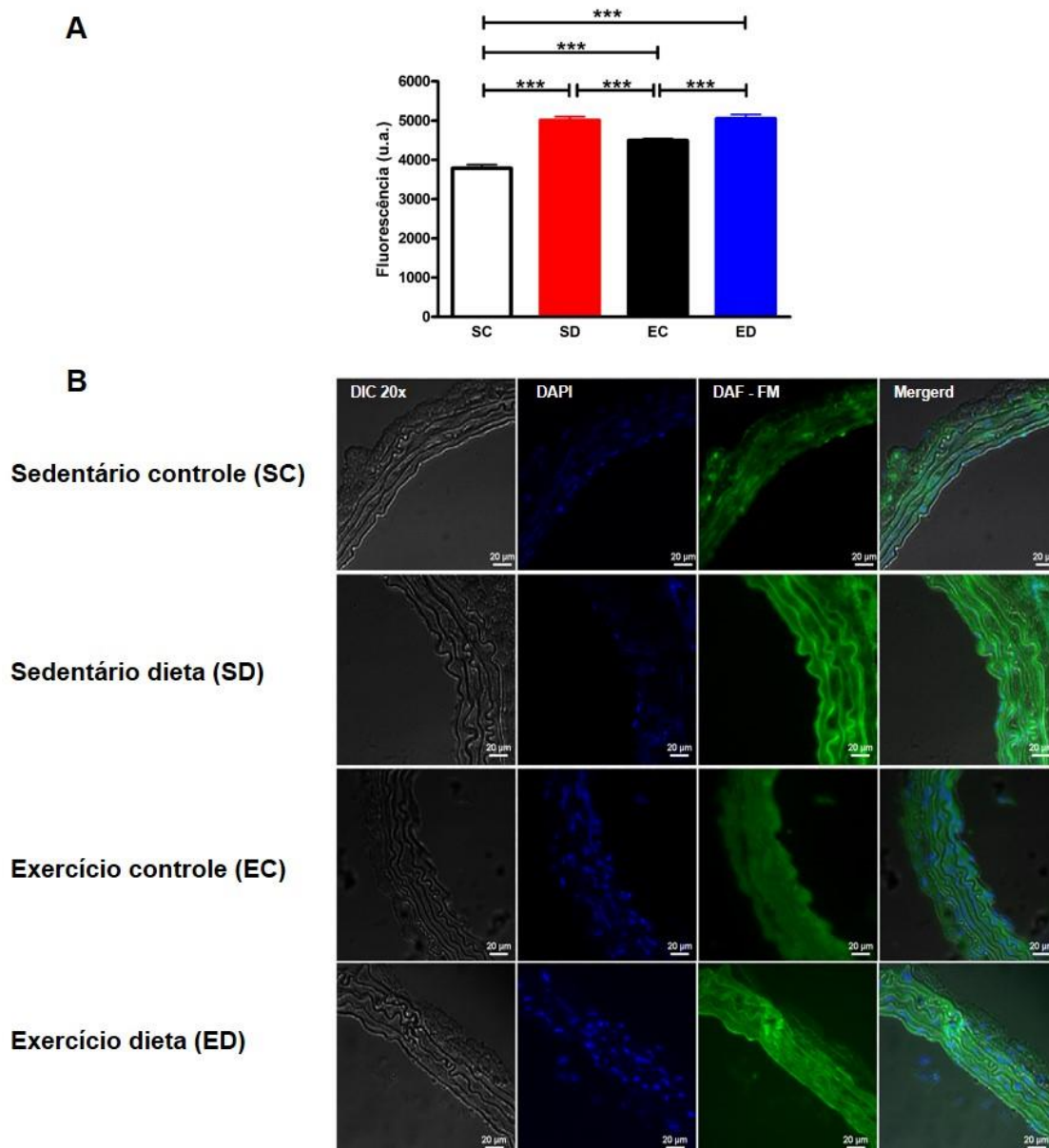


Figura 25 - Produção basal de NO em cortes histológicos de aorta dos grupos experimentais. (A) gráfico quantitativo da produção basal de NO avaliada pela fluorescência do DAF-FM (B) Imagens representativas das secções transversais da aorta. Fluorescência do DAF-FM foi expressa em intensidade por área analisada. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de 15 áreas analisadas por corte. N=4 animais. Teste t-Student \*\*\* $p < 0,001$ .

Avaliamos também o papel da via da ciclooxygenase na diminuição da contração da aorta dos animais alimentados com a dieta hiperglicídica. Para isso, os anéis de aorta foram previamente incubados com ibuprofeno (10  $\mu$ M), um inibidor não-seletivo das COXs. A inibição da COX não interferiu na contração da aorta em nenhum dos grupos (figura 26).

## Resultados

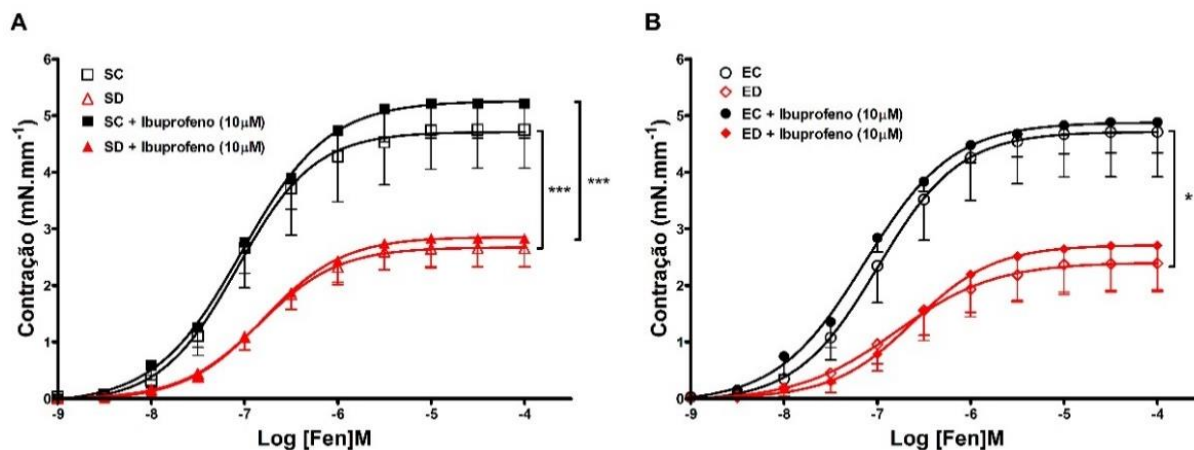


Figura 26 - Avaliação da participação da ciclooxigenase (COX) na menor resposta contrátil da aorta dos animais do grupo SD e ED. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com ibuprofeno (10µM), inibidor não seletivo das ciclooxigenases, não normalizou a resposta contrátil à fenilefrina dos animais alimentados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média ± EPM de N=5 animais. Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001.

### 3.3 - Avaliação morfométrica da aorta

A morfometria dos cortes histológicos da aorta não mostrou alterações estruturais significativas, como alteração no número de núcleos (figura 27 A), na espessura da parede da aorta (figura 27 B), ou na razão da área da parede pela área do lúmen (figura 27 C), e como ilustrado na figura 28.

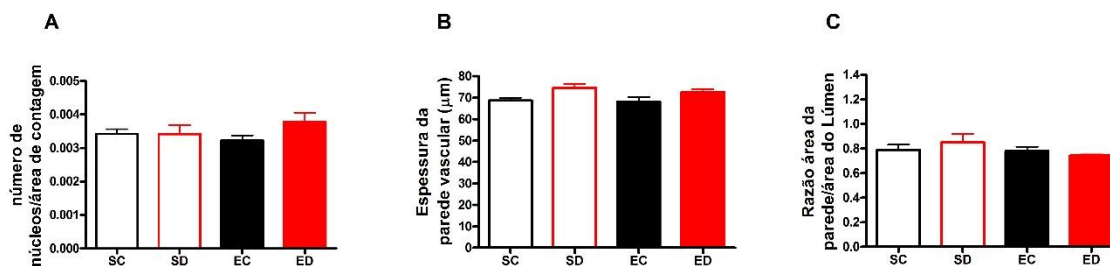


Figura 27 – Avaliação morfométrica da aorta. Não houve alterações no número de núcleos (A), na espessura da parede da aorta (B) e na razão da área da parede pela área do lúmen (C) entre os grupos experimentais. N= 4 animais.

## Resultados

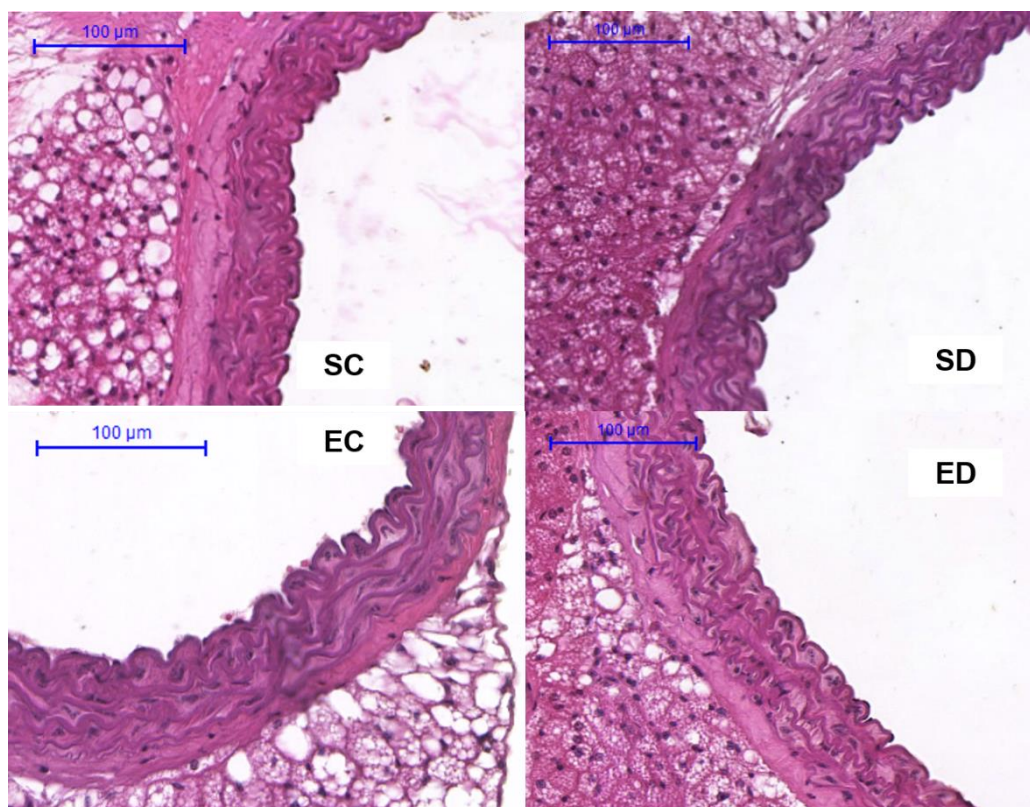


Figura 28 - Fotomicrografias representativas de fragmentos de cortes transversais da aorta torácica dos grupos experimentais. Objetiva de 20x de aumento, com ampliação de 20x pelo software de análise.

### 3.4 – Investigação das alterações de resposta contrátil na artéria mesentérica

Na artéria mesentérica, ao contrário da aorta, verificamos que houve um aumento de contração (57 %) nos animais sedentários que receberam a dieta quando comparados ao sedentário controle (SC  $E_{\max} = 3,89 \pm 0,14$ ; SD  $E_{\max} = 6,13 \pm 0,28$  mN/mm,  $p < 0,001$ ). O treinamento físico restaurou a contração aos níveis do controle (figura 29 A). A remoção do endotélio não reverteu a disfunção contrátil dos animais alimentados com a dieta (SC  $E_{\max} = 4,47 \pm 0,17$ ; SD  $E_{\max} = 6,9 \pm 0,53$  mN/mm,  $p < 0,001$ ; aumento de 54%; figura 29 B).

## Resultados

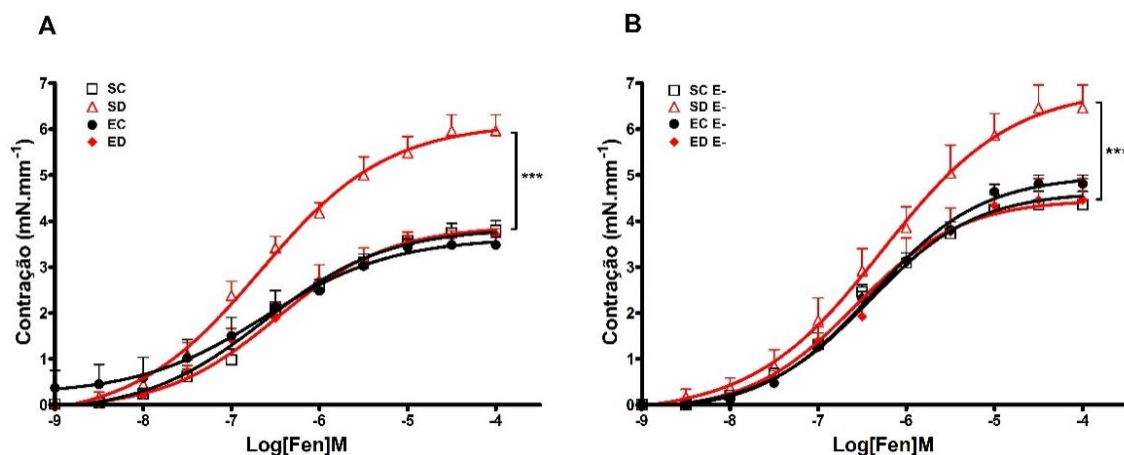


Figura 29 - Avaliação da resposta contrátil de anéis de artéria mesentérica dos animais SC, SD, EC e ED. (A) na presença e (B) ausência de endotélio funcional. Os animais sedentários tratados com a dieta hiperglicídica apresentaram uma maior resposta constritora à fenilefrina que foi prevenida pelo treinamento físico. A remoção do endotélio funcional não reverteu a maior resposta contrátil dos animais do grupo SD. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6 animais. \*\*\* $p<0,001$  Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

A inibição das NOS não restaurou a resposta contrátil dos animais sedentários obesos (SD + L-NAME  $E_{max} = 8,24 \pm 0,77$  x SC + L-NAME  $E_{max} = 5,79 \pm 0,26$ ;  $p<0,05$ , figura 30 A), bem como não modificou a resposta contrátil entre os grupos de animais treinados (figura 30 B).

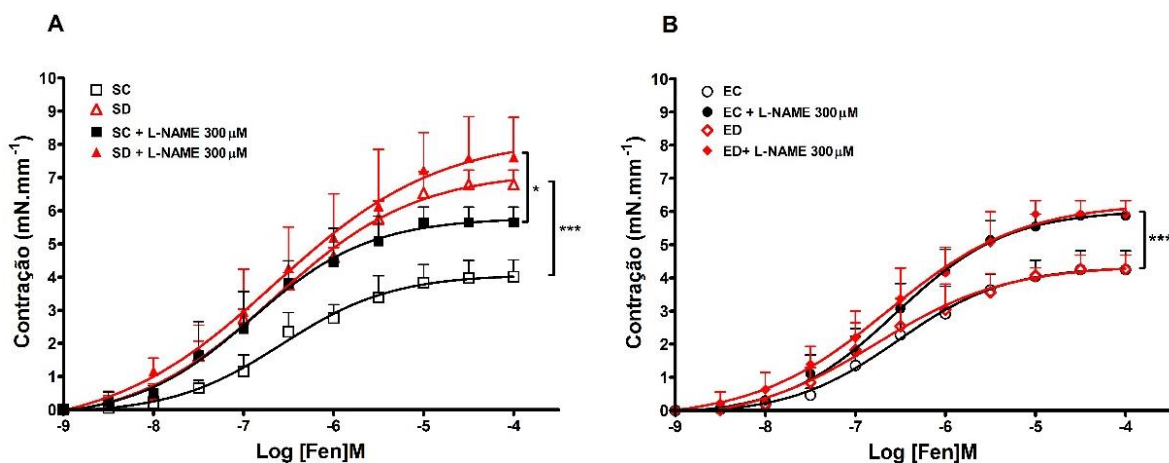


Figura 30 - Avaliação da participação da via das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) no aumento da resposta contrátil da artéria mesentérica do grupo SD. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com L-NAME (300 $\mu$ M), inibidor não-seletivo das NOS, restaurou parcialmente a resposta contrátil dos animais sedentários tratados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6-8 animais. \* $p<0,05$  e \*\*\* $p<0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

## Resultados

Como a inibição da via das NOS não normalizou a resposta contrátil dos animais obesos sedentários (SD), verificamos a via da ciclooxigenase (COX). O tratamento dos anéis de artéria mesentérica com o inibidor não seletivo das ciclooxigenases (Ibuprofeno 10  $\mu\text{M}$ ) ou com o inibidor seletivo da isoforma 2 da COX (celecoxibe 10  $\mu\text{M}$ ) normalizou a resposta contrátil do grupo SD (figura 31 A e 32 A). A inibição da via das ciclooxigenase não alterou a resposta contrátil da artéria mesentérica dos animais treinados (figura 31 B e 32B).

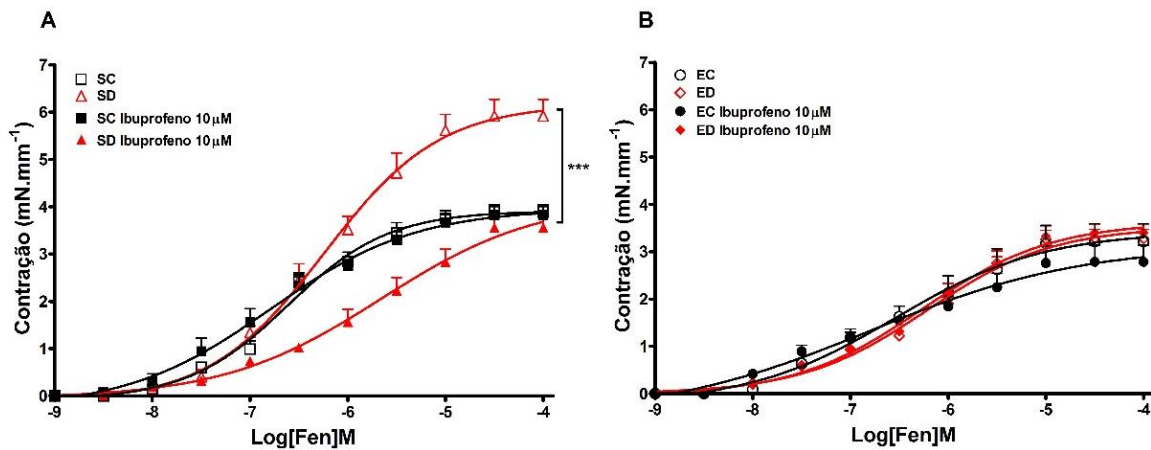


Figura 31 - Avaliação da participação da via das ciclooxigenases (COX) no aumento da resposta contrátil da artéria mesentérica do grupo SD. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com ibuprofeno (10 $\mu\text{M}$ ), inibidor não-seletivo das COX, normalizou a resposta dos animais sedentários tratados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6 animais. \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

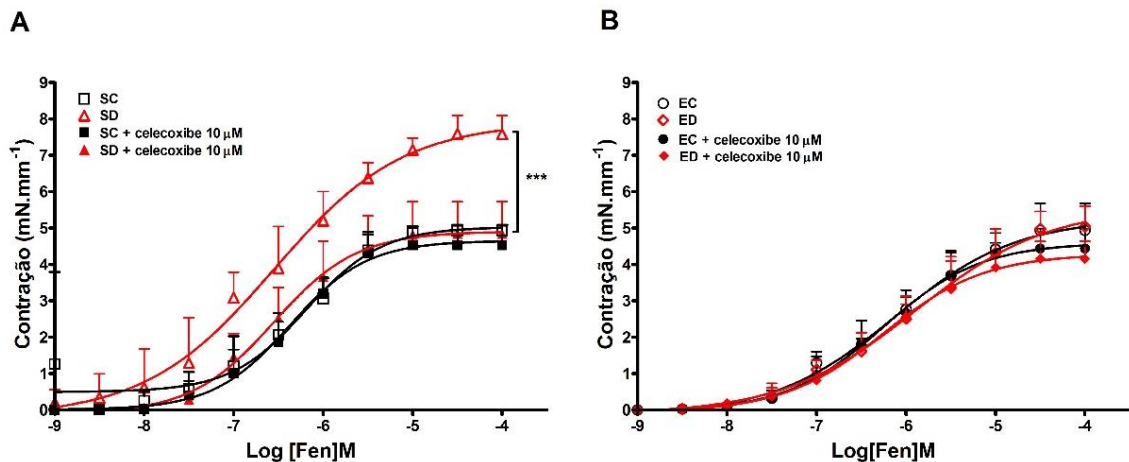


Figura 32 - Avaliação da participação da isoforma induzida ciclooxigenase (COX-2) no aumento da resposta contrátil da artéria mesentérica do grupo SD. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com celecoxibe (10 $\mu\text{M}$ ), inibidor seletivo da COX-2, normalizou a resposta dos animais sedentários tratados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6 animais. \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

## Resultados

Os receptores TP são importantes na sinalização da contração do músculo liso vascular pelos prostanoides derivados das COXs. Para avaliar o papel desses receptores na maior resposta contrátil dos animais obesos, anéis da artéria mesentérica foram incubados com um antagonista dos receptores TP, SQ29548 (10  $\mu$ M). O SQ29548 também reverteu o aumento de contração da artéria mesentérica à fenilefrina dos animais obesos, figura 33.

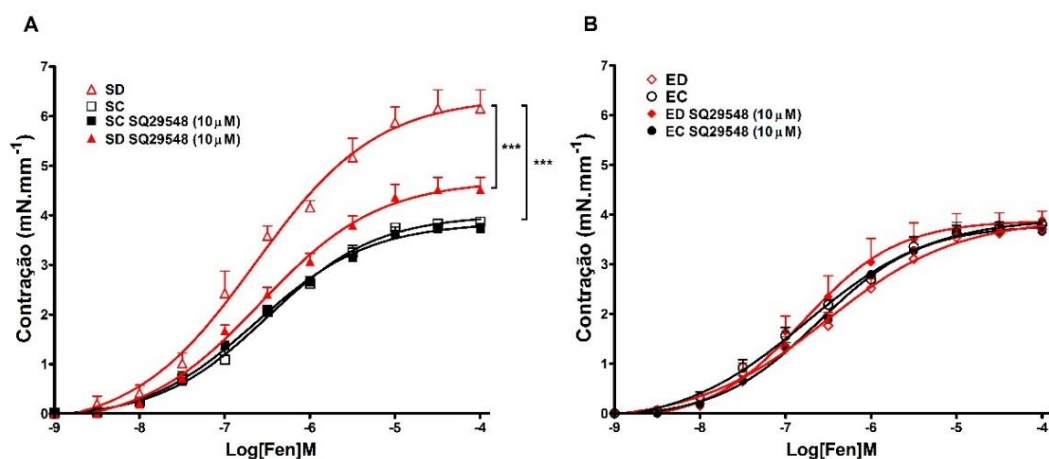


Figura 33 - Avaliação da participação dos receptores TP no aumento da resposta contrátil da artéria mesentérica do grupo SD. (A) animais sedentários e (B) treinados. A incubação prévia com SQ 29548 (10 $\mu$ M), antagonista dos receptores TP, normalizou a resposta dos animais sedentários tratados com a dieta hiperglicídica. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=6 animais. \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Os animais com silenciamento agudo da iNOS (figura 34) e os animais iNOS<sup>-/-</sup> (figura 35) tratados com a dieta hiperglicídica não desenvolveram a disfunção vascular contrátil na artéria mesentérica. Esses resultados sugerem uma comunicação entre a via de sinalização da iNOS com a via de sinalização da COX na disfunção contrátil da artéria mesentérica dos animais obesos.



## Resultados

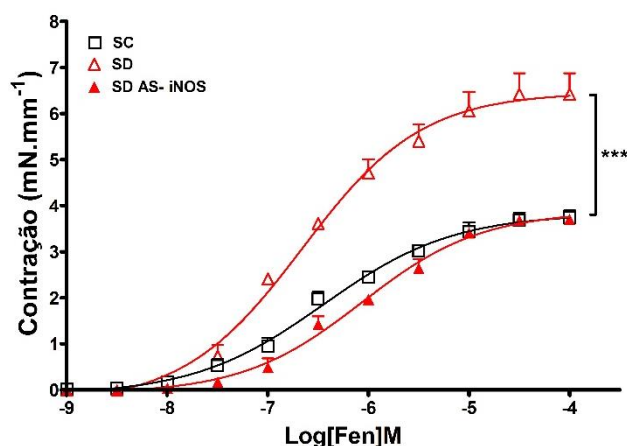


Figura 34 - Avaliação da participação da iNOS no aumento da resposta contrátil à fenilefrina na artéria mesentérica dos animais do grupo SD. O silenciamento agudo da iNOS foi capaz de prevenir a disfunção contrátil dos animais SD. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=4 animais. \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

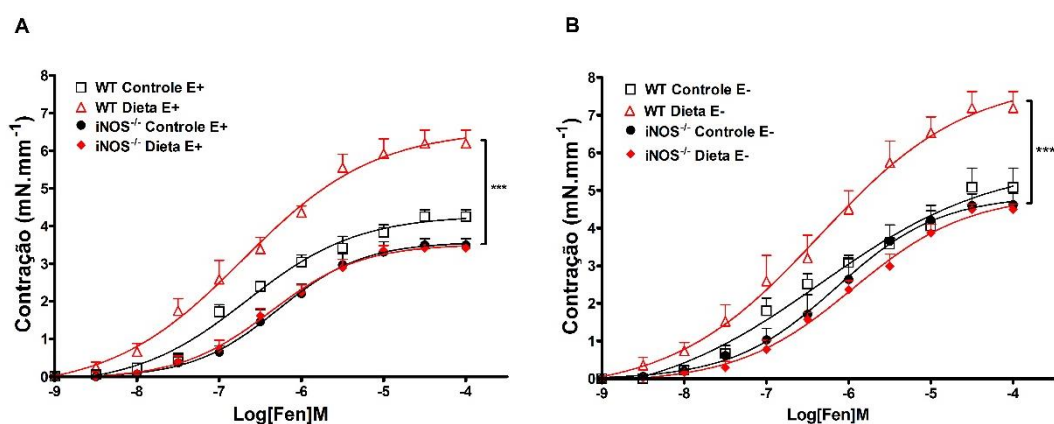


Figura 35 - Avaliação da resposta contrátil da artéria mesentérica dos animais com deleção gênica da iNOS. (A) animais selvagens e iNOS<sup>-/-</sup> com endotélio e (B) sem endotélio. Os animais iNOS<sup>-/-</sup> tratados com a dieta hiperglicídica não apresentaram alteração da resposta contrátil à fenilefrina. Os dados foram representados como média  $\pm$  EPM de N=4 animais. \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

É interessante aqui mencionar que a disfunção endotelial encontrada na artéria mesentérica mostrada na figura 11, foi completamente revertida aos níveis do controle, após o silenciamento agudo da iNOS (figura 36).

## Resultados

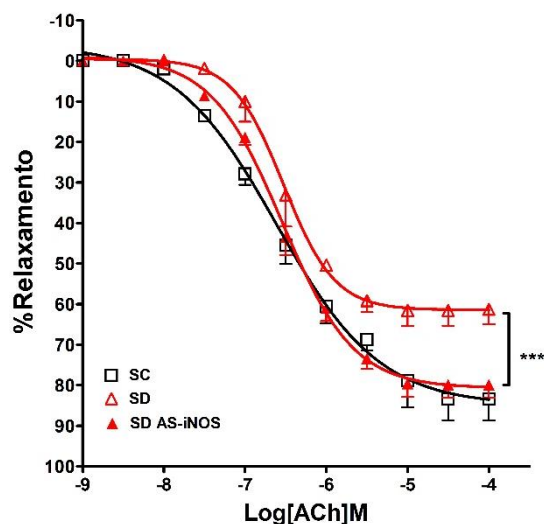


Figura 36 - Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina em anéis de artéria mesentérica de animais do grupo SD com silenciamento agudo da isoforma induzida da iNOS (SD AS-iNOS). O silenciamento agudo da iNOS preveniu a disfunção vasodilatadora dos animais alimentados com a dieta hiperglicídica. O dados são representados como média  $\pm$  EPM de N=4 animais. \*\*\* $p < 0,001$ , Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

As artérias mesentéricas dos animais obesos apresentaram uma maior expressão da COX-2 (102,9 % de aumento), do receptor-1 do TNF $\alpha$  (312,7% de aumento) e da subunidade p65 do fator de transcrição NFkB (186,4% de aumento), figura 37.

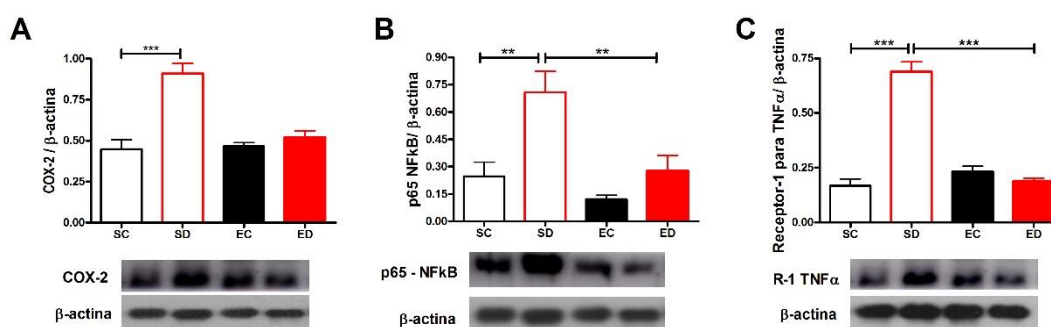


Figura 37 - Avaliação da expressão proteica da COX-2 (A), p65-NFkB (B) e do receptor -1 do TNF $\alpha$  (C) na artéria mesentérica dos grupos experimentais. O dados são representados como média  $\pm$  EPM de N=3 animais. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ , One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

## Resultados

---

### **4. Avaliação de marcadores pró e anti-inflamatórios.**

Como a via da iNOS e da COX são importantes em processos inflamatórios, analisamos algumas citocinas de caráter pró-inflamatório e anti-inflamatório. Os animais sedentários tratados com a dieta hiperglicídica mostraram estado inflamatório aumentado nos depósitos de gordura mesentérica, epididimal e retroperitoneal, mostrado pelo aumento na produção de TNF $\alpha$  e MCP-1. No caso da gordura mesentérica, também foi observada uma redução de IL-10. Essas alterações foram prevenidas pelo treinamento físico. Verificamos também um estado inflamatório sistêmico no grupo SD, caracterizado por um aumento na concentração circulante de TNF $\alpha$ , que não foi observado no grupo ED. A produção de TNF $\alpha$  e MCP-1 na gordura periaórtica não foi alterada pela dieta hiperglicídica ou pelo treinamento físico (Tabela 6).

## Resultados

Tabela 6 - Avaliação da produção de citocinas nos grupos SC, SD, EC e ED. Símbolos representam a análise estatística entre os grupos: \*SC x SD; #SC x EC; &SD x ED; §EC x ED; ºSCxED. Teste t-Student. N =5 animais.

Parâmetros	Citocinas	SC	SD	EC	ED
Soro	IL-10	39,34 ± 8,22	56,81 ± 7,59	63,43 ± 14,71	50,75 ± 10,70
	IL-6	16,03 ± 2,74	7,13 ± 2,57*	26,02 ± 9,30	8,00 ± 0,77 <sup>§</sup>
	TNFα	9,92 ± 3,25	37,81±7,27**	11,30 ± 3,64	13,20 ± 3,24 <sup>&amp;</sup>
	MCP-1	123,5 ± 25,09	113,0±13,66	137,2 ± 25,66	87,04 ± 22,61
Gordura mesentérica	IL-10	4,39 ± 1,35	0,379 ± 0,38*	15,23 ± 5,39 <sup>#</sup>	0,925 ± 0,62 <sup>§a</sup>
	IL-6	0,995 ± 0,44	1,26 ± 0,51	2,04 ± 0,53	1,35 ± 0,52 <sup>§</sup>
	TNFα	441,9±23,4	6436±114,4*	594,2±39,7	1746±104,1 <sup>&amp;a</sup>
	MCP-1	77,78±8,91	116,0±11,80	43,86±11,27	49,07±6,20
Gordura epididimal	IL-10	139,7 ± 19,12	199,3 ± 30,05	264,6±21,82 <sup>##</sup>	117,1 ± 8,83 <sup>§a</sup>
	IL-6	24,93 ± 3,05	26,41 ± 4,14	43,17 ± 5,59 <sup>#</sup>	18,51± 1,43 <sup>§§</sup>
	TNFα	335,3 ± 71,18	1143,0±15,3***	383,0 ± 18,5	351,8±81,13 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
	MCP-1	70,79 ± 15,01	195,2±14,73***	79,30 ± 16,77	67,89±9,02 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>
Gordura retroperitoneal	IL-10	136,2 ± 31,62	210,9 ± 34,07	229,8 ± 36,88 <sup>#</sup>	205,1 ± 43,59
	IL-6	15,86 ± 4,19	48,59 ± 8,82*	21,57 ± 1,92	20,43±5,05 <sup>&amp;</sup>
	TNFα	455,5 ± 48,40	1834,0± 36,1**	714,3±27,9	579,5±76,35 <sup>&amp;§</sup>
	MCP-1	95,97 ± 10,18	289,3 ± 36,87**	119,7±24,69	99,78±4,80 <sup>&amp;&amp;</sup>
Gordura periaórtica	TNFα	1541,0 ± 191,6	1515,0 ± 32,4	1019,0 ± 30,2	1498,5 ± 84,5
	MCP-1	58,30 ± 8,112	48,81 ± 7,188	43,25 ± 8,258	56,08 ± 11,39

*Discussão*

### Discussão

Nesse trabalho estudamos as alterações vasculares em um modelo de obesidade que não apresentava doenças associadas como hipertensão arterial e diabetes. Observamos que a aorta e a artéria mesentérica dos animais obesos apresentaram alterações vasculares diferentes: 1) redução da resposta contrátil à fenilefrina na aorta sem alterações de relaxamento; 2) aumento da resposta contrátil à fenilefrina e redução do relaxamento à acetilcolina na artéria mesentérica. Os mecanismos envolvidos nas alterações funcionais tanto da aorta como da artéria mesentérica dos animais obesos estão relacionados à ativação da via TNF $\alpha$  / iNOS, provavelmente através do receptor R1 do TNF $\alpha$  e do fator de transcrição gênica NF $\kappa$ B. O treinamento físico de longa duração induziu alterações benéficas aos animais como a redução do “status” pró-inflamatório que foi suficiente para atenuar a ativação da via do TNF $\alpha$ /iNOS/COX-2 e prevenir as alterações funcionais da artéria mesentérica.

Diversos trabalhos mostram vários aspectos importantes no desenvolvimento da obesidade. Eles destacam o crescimento exagerado do tecido adiposo branco visceral como um importante fator de risco para o desenvolvimento da hipertensão e da resistência à insulina. Esse crescimento do tecido adiposo branco resulta em uma disfunção dos adipócitos, caracterizada por uma mudança no perfil secretório dessas células, com o aumento da secreção de leptina e de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$ . Essa disfunção pode acarretar também o aumento da liberação de ácidos graxos saturados e o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo [85, 93].

Nos animais obesos sedentários (grupo SD) do nosso trabalho, observamos alterações semelhantes às discutidas acima como, por exemplo, o expressivo aumento dos tecidos adiposos viscerais (mesentérico, epididimal e retroperitoneal) em consequência da maior ingestão calórica (tabela 3). O tecido adiposo branco visceral dos obesos apresentou aspectos de um tecido disfuncional, com maior produção de leptina, que foi detectada pelo aumento da concentração sérica desse hormônio. Além disso, o tecido adiposo dos animais obesos mostrou um perfil pró-inflamatório de secreção de citocinas, com

## Discussão

---

aumento da produção de TNF $\alpha$  e de MCP-1 (tabela 6). O aumento da produção de MCP-1 facilitaria o recrutamento de monócitos da corrente sanguínea para o tecido adiposo e a sua diferenciação para macrófagos [7]. O aumento do número de macrófagos no tecido adiposo poderia exacerbar o processo inflamatório local, estimulando uma maior produção de TNF $\alpha$  e a instalação de um ciclo vicioso, o que acentuaria o processo inflamatório e a disfunção do tecido. O TNF $\alpha$  pode ativar os adipócitos vizinhos, os macrófagos ou cair na corrente sanguínea e agir em tecidos mais distantes. Verificamos, nos nossos animais obesos, um aumento da concentração sanguínea de TNF $\alpha$ , sugerindo um estado inflamatório sistêmico que poderia desencadear um processo inflamatório em outros tecidos. O TNF $\alpha$  pode alterar a função de outros tecidos ao se ligar a seu receptor de membrana e ativar, entre outros mecanismos, a via dos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e AP-1, estimulando a expressão de outras proteínas pró-inflamatórias como, por exemplo, iNOS, COX e proteínas de adesão, bem como a sua própria síntese [122]. A expressão dessas proteínas resultaria também no aumento da produção de NO encontrado no presente trabalho.

Além disso, o tecido adiposo mesentérico dos animais obesos mostrou uma redução na concentração de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, que contra regula os efeitos do TNF $\alpha$  [123]. Essa redução pode contribuir para o processo inflamatório e para o aumento da produção de TNF $\alpha$  observados no tecido adiposo dos animais obesos.

Outra citocina envolvida em processos inflamatórios e também produzida pelo tecido adiposo é a IL-6. Elevados níveis circulantes de IL-6 são considerados um fator de risco para diabetes, mesmo na ausência de obesidade, pois essa citocina é capaz de inibir a sinalização intracelular da insulina [92, 124]. Sabe-se também que camundongos que não expressam IL-6 tornam-se obesos e apresentam alterações no comportamento alimentar, no gasto energético e na termogênese [93, 125]. No entanto, o papel da IL-6 na obesidade não está completamente compreendido. Em relação a IL-6 nos animais obesos deste trabalho, somente o tecido adiposo retroperitoneal apresentou uma produção maior dessa citocina. Esse aumento não refletiu na concentração sérica de IL-6, a qual, pelo contrário, mostrou-se reduzida quando comparada com o grupo SC.

## Discussão

---

Esse resultado sugere uma diferença no grau inflamatório dos diferentes tecidos adiposos analisados, sendo o tecido adiposo retroperitoneal mais afetado, visto que observamos nesse tecido o aumento da produção de TNF $\alpha$ , MCP-1 e IL-6. Esses resultados também sugerem que a IL-6 não está envolvida nas alterações vasculares encontradas no presente trabalho.

O tecido adiposo branco apresenta algumas diferenças morfológicas e funcionais quando comparado ao tecido adiposo marrom. O tecido adiposo branco é um importante estoque energético na forma de triglicerídeos, responde à insulina para captação de glicose e produz fatores parácrinos e endócrinos que irão modular várias funções do organismo. Por outro lado, o tecido adiposo marrom, em menor proporção, produz fatores endócrinos, mas é principalmente caracterizado pelo seu alto conteúdo de mitocôndrias e por expressar grandes quantidades da proteína desacopladora do tipo 1 (UCP-1). Essas características fazem com que o tecido adiposo marrom contribua com o gasto energético, pois a elevada expressão de UCP-1 desacopla o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, resultando na transformação de grande parte da energia obtida da alimentação em calor. Esse mecanismo também caracteriza o papel do tecido adiposo marrom na termogênese adaptativa e na termogênese sem tremor em resposta ao frio e à estimulação adrenérgica [126]. Margareto e colaboradores mostraram que a obesidade induzida por dieta estimula a termogênese no tecido adiposo marrom por aumentar a expressão de UCP [127], e o aumento da massa desse tecido na obesidade pode ser uma tentativa do organismo de conter o ganho de peso [107]. No nosso trabalho, verificamos resultado semelhante ao de Margareto e colaboradores. A massa de tecido adiposo marrom escapular foi maior nos animais obesos sedentários. Esse resultado sugere que o tratamento com a dieta hiperglicídica estimulou alterações estruturais nesse tecido, que levaram ao aumento da sua massa (tabela 3).

Avaliamos também o tecido adiposo perivascular da aorta torácica (PVAT) dos animais. Esse tecido apresenta adipócitos brancos e marrons e pode participar da modulação da resposta vascular e do controle da termogênese. Observamos que o PVAT do grupo SD também estava aumentado. Chatterjee e



## Discussão

---

colaboradores mostraram que a obesidade induzida por dieta enriquecida com gordura levou à disfunção do tecido adiposo perivascular, com redução da produção de adiponectina e aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, MCP-1 e IL-8 [128]. No entanto, não encontramos diferença na produção de MCP-1 e TNF $\alpha$  no PVAT dos animais obesos do nosso trabalho. É importante mencionar que a figura 28 mostra claramente a diferenciação de células do tecido branco em células do tecido marrom no PVAT aórtico. Isto pode explicar o fato deste tecido não produzir citocinas pró-inflamatórias no nosso trabalho. As diferenças encontradas entre nossos dados e aqueles encontrados por Chatterjee e colaboradores [125], pode estar relacionada às diferentes dietas indutoras de obesidade utilizadas nos dois trabalhos, ou ao tempo de tratamento para induzir o ganho de peso.

A presença de um estado pró-inflamatório nos animais obesos e uma maior concentração circulante de insulina (tabela 4) sugerem uma possível alteração do metabolismo de açúcares e lipídios. Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$ , podem interferir na via de sinalização da insulina, inibindo vários pontos cruciais. Jiang e colaboradores mostraram que o TNF $\alpha$  diminuía a sensibilidade à insulina por induzir a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) no resíduo de serina 307, inibindo a transdução do sinal desse hormônio em células endoteliais da retina de animais de um modelo de retinopatia. Eles verificaram também que o tratamento com etanercept, um antagonista dos receptores de TNF $\alpha$ , melhorava a sensibilidade à insulina dessas células [129]. No entanto, não encontramos alteração nos testes de intolerância à glicose (figura 6) e de sensibilidade à insulina (figura 7) entre os animais controle (grupo SC) e os animais obesos. Esses resultados sugerem que, mesmo com um aumento no aporte de carboidratos e lipídios, o aumento na concentração de insulina desses animais foi capaz de manter a glicemia em níveis normais.

Outro efeito deletério da obesidade é o acúmulo de gordura em outros tecidos, como o fígado, pâncreas e músculo esquelético, o que levaria ao desenvolvimento de disfunção nesses tecidos, em consequência da lipotoxicidade ou, até mesmo, ativação das vias de morte celular, lipoapoptose

## Discussão

---

[93, 130]. Diferentemente de outros modelos de obesidade induzida por dieta [131], no modelo de obesidade caracterizado neste trabalho, os animais obesos não apresentaram acúmulo de lipídeos hepáticos e não houve diferença na concentração de ácidos graxos livres e triglicérides, sugerindo que o tratamento por dois meses com a dieta hiperglicídica induziu obesidade nos animais sem provocar severas modificações no metabolismo de lipídios e açúcares.

Nesse sentido, alguns trabalhos têm mostrado que o tipo de nutriente utilizado para aumentar o valor calórico da ração pode induzir diferentes alterações metabólicas nos animais [132, 133]. Dietas enriquecidas com gordura são capazes de induzir alterações mais severas em um tempo menor de tratamento do que dietas enriquecidas com açúcar. Tillman e colaboradores relataram que 12 semanas de tratamento com dieta enriquecida com frutose não induziu ganho de peso e alterações nas concentrações séricas de glicose, triglicérides e ácidos graxos de camundongos C57 [134]. No entanto, o tratamento de camundongos C57 com dieta enriquecida com gordura por 15 semanas foi capaz de induzir ganho de peso corporal, aumentar a concentração sérica de colesterol e diminuir a tolerância à glicose dos animais [134-136].

Os animais obesos desse trabalho, como já mencionado, foram alimentados com uma dieta enriquecida com leite condensado e açúcar que, predominantemente, apresenta um aumento de carboidratos simples na sua composição. Apesar desses animais não apresentarem alterações na concentração sérica de glicose, triglicérides e ácidos graxos, eles mostraram um aumento na concentração de colesterol total, principalmente da fração LDL do colesterol, o que resultou no aumento da razão cLDL/cHDL (tabela 4). A hipercolesterolemia é um importante fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, e o aumento dos níveis de LDL circulantes pode levar ao acúmulo de colesterol na parede arterial com indução de uma resposta inflamatória local e sistêmica [137]. No entanto, não identificamos alteração estrutural da parede da aorta (figura 27) e não foi observada formação de placas arterioscleróticas nas análises histológicas realizadas da aorta torácica dos animais obesos (figura 28). Porém, não foram realizados experimentos específicos, como cortes seriados do arco aórtico ou marcação de constituintes da placa, que nos

## Discussão

---

permitted afirmar, com certeza, que os animais obesos não desenvolveram ateromas.

Um protocolo de treinamento físico de intensidade moderada é capaz de induzir adaptações cardiorrespiratórias benéficas ao organismo [138], como a diminuição da frequência cardíaca de repouso, a melhora na função vascular, o aumento na sensibilidade à insulina e a diminuição do estresse oxidativo [139]. No entanto, esses benefícios variam conforme a intensidade e a duração do protocolo de treinamento utilizado [138-141]. Os animais dos grupos treinados desse trabalho tiveram um maior desempenho físico quando comparados aos grupos sedentários. Essa melhora de desempenho foi observada pela maior capacidade dos animais treinados de produzir trabalho durante o teste de esforço máximo, figura 8. Os animais treinados também apresentaram uma maior capacidade aeróbica (figura 9B), ou seja, ambos os animais dos grupos EC e ED consumiram uma menor quantidade de oxigênio para realizar uma mesma carga de trabalho, quando comparados aos animais do grupo sedentários. Essa diferença pode ser observada pela maior eficiência mecânica dos animais treinados (figura 10). O treinamento físico também reduziu o consumo de O<sub>2</sub> basal, sugerindo uma maior eficiência energética basal nesses animais. É importante destacar que a dieta não reduziu o desempenho dos animais treinados, grupos ED, e também não reduziu o desempenho dos animais sedentários, grupo SD.

Semelhante a outros trabalhos [106, 113, 142], o treinamento físico reduziu o ganho de peso e o aumento do tecido adiposo nos animais obesos. Encontramos uma redução de 19,8% do tecido adiposo epididimal, 23,2% do mesentérico, 27,7% do retroperitoneal e de 15,6% do tecido adiposo marrom, quando comparados aos animais do grupo SD. Essa redução está relacionada a menor ingestão calórica desses animais, bem como, ao maior gasto energético devido à treinamento físico. O treinamento físico também melhorou o metabolismo de lipídios e carboidratos, o que foi demonstrado pela normalização das concentrações séricas de colesterol, de cLDL, de insulina e leptina nos animais do grupo ED.

## Discussão

---

A prática de exercício físico regular pode aumentar a sensibilidade à insulina por diversas ações, tais como: diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e modificação de vias de sinalização intracelular, como a via PI3K/AKT no adipócito e no músculo esquelético [106]. Os animais do grupo EC apresentaram uma melhor resposta no teste de sensibilidade à insulina, quando comparados aos outros grupos, figura 7. Essa maior sensibilidade à insulina do grupo EC pode estar relacionada à menor ativação da via do NFκB do tecido adiposo. A ativação da via do NFκB, por citocinas como o TNFα, pode induzir a resistência à insulina devido à modificação na expressão de proteínas da via de sinalização desse hormônio, como o receptor da insulina, o substrato do receptor de insulina do tipo 1 (IRS-1) e o transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4) [122]. Portanto, a inibição do NFκB pode melhorar a sensibilidade à insulina [143]. Nos depósitos de gordura mesentérico, epididimal e retroperitoneal dos animais EC, observamos um aumento da produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória importante, capaz de inibir as ações do TNFα, por inibir a via do NFκB [144]. Nos animais ED, a produção de IL-10 está diminuída nos depósitos de gordura mesentérico e epididimal. Assim, essa diferença de produção de IL-10 explicaria a maior sensibilidade à insulina encontrada nos animais EC.

A capacidade do treinamento físico de modular a produção de citocinas é bem aceita na literatura. No entanto, quais citocinas o treinamento físico é capaz de estimular a produção ou quais ele é capaz de inibir, ainda é motivo de controvérsias. Esse efeito do treinamento sob o estado inflamatório do organismo pode variar conforme o tecido analisado, a doença pré-existente e o modo, a intensidade e a duração do protocolo de treinamento escolhido. Baynard e colaboradores não encontraram diferença na transcrição do mRNA de TNFα, MCP-1 e leptina no tecido adiposo de camundongos treinados por seis semanas alimentados com dieta controle ou com dieta enriquecida com gordura [136]. Por outro lado, Linden e colegas verificaram que oito semanas de treinamento físico também não foram capazes de normalizar os elevados níveis de expressão gênica do TNFα e IL-6 dos animais tratados com dieta hiperlipídica. Porém, 12 semanas de treinamento reduziram significativamente a expressão gênica de TNFα desses animais [141]. No nosso trabalho, utilizamos um protocolo de treinamento de oito semanas, na intensidade máxima de 60% da velocidade

## Discussão

---

máxima obtida no teste de esforço. Verificamos que esse protocolo de treinamento, por si só, aumentou a produção de IL-10 nos tecidos adiposos mesentérico, epididimal e retroperitoneal, e também aumentou a produção de IL-6 no tecido adiposo epididimal. Observamos também que o treinamento físico foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL-6 e MCP-1) nos animais alimentados com dieta hiperglicídica (tabela 6). Como já mencionado, essas diferenças podem ser explicadas pelo protocolo de treinamento utilizado, visto que os dois trabalhos citados utilizaram uma intensidade maior, entre 70-75% do VO<sub>2</sub> max. Além disso, o treinamento físico pode modular diferentemente a produção de citocinas pelos tecidos, como também foi observado no nosso trabalho, quando não encontramos mudança na produção de TNF $\alpha$  e MCP-1 no tecido adiposo perivascular da aorta entre os grupos experimentais.

O processo pró-inflamatório tecidual dos animais obesos refletiu em um processo inflamatório sistêmico, com aumento das concentrações circulantes de TNF $\alpha$ , podendo induzir modificações em outros tecidos, como as alterações funcionais encontradas na aorta dos animais obesos. Na artéria mesentérica dos animais obesos é muito provável que as alterações encontradas sejam decorrentes da inflamação sistêmica somada à inflamação local que ocorre no tecido adiposo mesentérico.

Comumente, indivíduos obesos e modelos experimentais de obesidade apresentam outras doenças associadas, como a hipertensão, o diabetes e a aterosclerose [1, 3, 9, 44, 145]. A disfunção endotelial ocorre, devido a um desequilíbrio na produção de fatores contráteis e relaxantes derivados do endotélio, o que resulta no aumento da resposta constritora e na diminuição da resposta vasodilatadora. No modelo em estudo, temos animais obesos normotensos e que não apresentam alteração na glicemia e na sensibilidade à insulina. Neste modelo podemos estudar as alterações vasculares provocadas pela obesidade, sem a interferência daquelas provocadas pelas doenças associadas. Os nossos dados mostram que existem alterações vasculares claras e distintas na artéria mesentérica e aorta dos animais obesos. Na aorta, não existe disfunção endotelial o que pode ser constatado pela falta de diminuição

## Discussão

---

da resposta vasodilatadora à acetilcolina e também por não haver redução da expressão da eNOS, figura 11 e 21. Além disso, a contratilidade está diminuída.

O tecido adiposo perivascular (PVAT) pode modular a resposta vascular pela liberação de fatores anti-contráteis. No entanto, na obesidade pode ocorrer a disfunção do PVAT, com mudança do perfil de secreção dos adipócitos, e consequente instalação de um estado pró-inflamatório. Esse estado alterado resultaria na diminuição da ação anti-contrátil do PVAT, acarretando a redução da resposta vasodilatadora da aorta [146]. No entanto, não observamos aumento da produção de TNF $\alpha$  e MCP-1 no PVAT dos animais obesos, sugerindo que no nosso modelo a função desse tecido não está prejudicada. Também não existe correlação entre o PVAT as modificações de função vascular encontradas na aorta. Uma possível explicação para esta diferença seria o fato da falta de doenças associadas ao nosso modelo. No entanto, os trabalhos que estudam o efeito do PVAT sobre a função vascular na obesidade não abordam plenamente o perfil de citocinas e caracterização de doenças associadas e estudos adicionais são necessários para esclarecer esta questão.

O treinamento físico não alterou a resposta vasodilatadora da aorta dos animais. No entanto, a aorta dos animais treinados controle, grupo EC, mostrou uma maior expressão da eNOS, figura 21. Essa modificação não foi encontrada nos animais treinados do grupo ED. O aumento da expressão da eNOS ou a modulação de sua atividade são adaptações bem conhecidas promovidas pelo treinamento físico [139]. Calvert e colegas verificaram que o exercício físico regular protege o coração dos danos induzidos pelo processo de isquemia e reperfusão, por um mecanismo dependente do aumento do NO, via ativação da eNOS no cardiomiócito [147]. Em outro modelo, Araújo e colaboradores verificaram que o treinamento físico aumentou a expressão da eNOS no PVAT de animais treinados, sem alteração a resposta vasodilatadora da aorta [148]. Essa divergência de resultado sugere que, sem uma alteração funcional, a ativação da eNOS pelo exercício pode ser negligenciada. Assim, mais estudos são necessários para esclarecer os efeitos do treinamento físico na função vascular na ausência de uma condição patológica.

## Discussão

---

Ao contrário do ocorrido na aorta, os animais obesos sedentários apresentaram uma redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina da artéria mesentérica quando comparados ao grupo controle. Essa disfunção endotelial da artéria mesentérica pode ser consequência da ativação da via do TNF $\alpha$  pelo tecido adiposo mesentérico desses animais (Tabela 6 e figura 37). Já é bem conhecido que a ativação da via do TNF $\alpha$  pode induzir estresse oxidativo e produzir disfunção endotelial [149]. Um resultado interessante foi que o treinamento físico reduziu significativamente a ativação da via do TNF $\alpha$  e, conseqüentemente, a disfunção endotelial. (Tabela 6 e figura 36 e 37). Outro ponto importante é a participação da iNOS no mecanismo da disfunção endotelial da artéria mesentérica. O silenciamento agudo da iNOS normalizou a resposta vasodilatadora dos animais obesos (figura 36). Smith e colaboradores mostraram que o aumento da expressão da iNOS em pacientes hipertensos atenuou a resposta vasodilatadora de vasos da pele [150]. A diminuição da resposta foi associada à ativação da arginase-1, enzima que degrada a L-arginina e, portanto, compete com a eNOS pelo substrato, e, conseqüentemente, reduz a produção de NO. Dunn e colegas observaram uma estreita relação entre a iNOS e arginase-1. Eles mostraram que a ativação da arginase-1 por S-nitrosação é dependente da iNOS [151]. Essa associação entre iNOS/arginase-1/eNOS pode explicar a restauração da função endotelial da artéria mesentérica dos animais obesos pelo silenciamento agudo da iNOS.

Em relação à resposta vasoconstritora também encontramos resultados diferentes quando comparamos a aorta e a artéria mesentérica dos animais obesos.

A aorta dos animais tratados com a dieta hiperglicídica (grupo SD e ED) apresentou uma redução da resposta contrátil à fenilefrina, em relação aos seus respectivos grupos controle (SC e EC). Essa redução foi dependente do endotélio e revertida pela inibição não-seletiva da via da NOS. Nos animais do grupo SD, a hiporresponsividade à fenilefrina foi totalmente dependente da ativação da iNOS, pois a inibição seletiva e o silenciamento agudo da iNOS normalizaram a resposta contrátil desses animais. Esses resultados sugerem que a redução da resposta contrátil da aorta dos animais obesos foi devido ao

## Discussão

---

aumento da produção de NO pela iNOS, que contrapõe o efeito contrátil da estimulação  $\alpha_1$ -adrenérgica. Corroborando esta hipótese, os nossos experimentos confirmaram o aumento da produção basal de NO. A participação da iNOS na hiporresponsividade da aorta à fenilefrina também foi confirmada com a deleção gênica dessa isoforma. A aorta dos animais iNOS<sup>-</sup>alimentados com a dieta hiperglicídica não apresentou redução da resposta contrátil.

A indução da iNOS no nosso modelo de obesidade pode ser um processo de adaptação fisiopatológica para acomodar a maior quantidade de sangue ocasionada pelo aumento do metabolismo e do tecido adiposo gerado pela dieta. No entanto, é possível que a progressão da doença poderia desencadear uma disfunção vascular aórtica, pois a contínua superprodução de NO pela iNOS levaria à escassez de substrato e de co-fatores importantes para o bom funcionamento das NOS constitutivas. Isso resultaria no desacoplamento dessas isoformas, no aumento da produção de ânion superóxido gerando disfunção endotelial [3, 61, 96, 145, 151].

Os animais obesos também apresentaram aumento da expressão do receptor-1 do TNF $\alpha$ , sugerindo que o aumento da expressão da iNOS, na aorta desses animais, pode ser resultado da ativação da via TNF $\alpha$  e do seu receptor.

Nos animais treinados tratados com a dieta hiperglicídica (ED), o treinamento físico não alterou a menor resposta vasoconstritora à fenilefrina da aorta. Os mecanismos envolvidos nessa hiporresponsividade do grupo ED parecem diferir dos mecanismos envolvidos na alteração apresentada pelo grupo SD. Os nossos resultados mostram que a iNOS participa nessa alteração, pois a inibição seletiva dela aumentou a resposta contrátil no grupo ED, e a aorta desses animais também mostrou um aumento da expressão da iNOS e do receptor-1 do TNF $\alpha$ . No entanto, a participação da iNOS foi menor do que a observada nos animais obesos sedentários, pois a inibição da iNOS não normalizou a resposta contrátil dos animais ED. A eNOS parece ter um papel importante nessa menor resposta vasoconstritora, visto que a inibição seletiva dessa isoforma também aumentou a resposta contrátil da aorta dos animais do grupo ED. Esses resultados estão em conformidade com trabalhos da literatura que relatam que o treinamento físico regular é capaz de modular a expressão de



## Discussão

---

proteínas importantes na função vascular, como a eNOS, e reduzir processos inflamatórios como, por exemplo, a diminuição da concentração sérica de TNF $\alpha$  [102, 138, 141]. Os nossos resultados corroboram estes dados, uma vez que o grupo treinado mostrou uma atenuação do status inflamatório com diminuição do TNF $\alpha$ , do seu receptor e da expressão da iNOS. Portanto, os nossos resultados mostram que o exercício físico regular aumenta a funcionalidade da eNOS, contribuindo no grupo ED, para a diminuição de contratilidade da aorta. Estes dados sugerem uma adaptação fisiológica para suprir a maior demanda de sangue exigida pelo exercício. Também, e mais importante, o exercício físico regular, diminuindo a iNOS e aumentando a participação da eNOS pode proteger o sistema vascular contra os danos que gerariam a disfunção endotelial com a progressão da obesidade.

A artéria mesentérica dos animais obesos sedentários, por outro lado, apresentou uma maior resposta contrátil à fenilefrina. Como essa artéria é um exemplo de vaso de resistência, ela exerce um papel importante no controle da pressão arterial, e o aumento da resposta contrátil nesse tipo de vaso pode predispor os animais ao desenvolvimento de hipertensão [84, 152, 153]. A disfunção contrátil encontrada no grupo SD não foi dependente do endotélio e também não foi normalizada pela inibição farmacológica das NOS. Ela está relacionada, provavelmente, ao estado inflamatório do tecido adiposo mesentérico adjacente e ao estado inflamatório sistêmico de baixo grau, observado nesses animais. Os nossos resultados sugerem que o estado pró-inflamatório, observado nos animais obesos, resultou na ativação da via da ciclooxigenase, principalmente, na indução da COX-2 e na síntese de fatores contráteis, como o tromboxano A<sub>2</sub>, o que poderia explicar o aumento da resposta contrátil observada nesses animais. Sabe-se que a via do TNF $\alpha$  pode induzir a expressão de proteínas como a COX-2 e a iNOS, através da ativação do fator de transcrição gênica NF $\kappa$ B [154]. Neste trabalho, verificamos uma estreita relação da via da COX-2 e da iNOS, uma vez que o silenciamento agudo da iNOS normalizou a resposta contrátil dos animais tratados com a dieta. Esse resultado sugere um “crosstalk” entre a via da COX-2 e da iNOS no aumento de contração da artéria mesentérica na obesidade. Dados da literatura suportam a nossa hipótese. Pérez-Sala e Lamas S, mostraram que o NO derivado da iNOS

## Discussão

---

é um importante regulador da atividade e expressão da COX-2 e que prostanoídes derivados da COX-2 podem também influenciar a expressão da iNOS [155]. É importante aqui lembrar que a inibição da NOS com L-NAME não modificou a resposta contrátil na artéria mesentérica. Isto sugere que o silenciamento da iNOS provoca alterações mais a longo prazo como inibição da expressão da COX-2 [155]. Verificamos também que, na artéria mesentérica dos animais obesos, a subunidade p65 do NFκB estava mais expressa, juntamente com a COX-2 e o receptor-1 do TNFα.

Em relação à influência do treinamento na função vascular da artéria mesentérica, observamos que o treinamento físico utilizado foi capaz de prevenir a sua disfunção, induzida pela dieta hiperglicídica. Esse resultado pode estar relacionado à resolução do estado inflamatório desses animais, visto que o exercício normalizou os níveis de TNFα circulantes e reduziu a produção dessa citocina no tecido adiposo mesentérico. Além disso, o treinamento físico normalizou a expressão proteica da COX-2, do NFκB e do receptor-1 do TNFα, corroborando a hipótese de que a ativação da via do TNFα é fundamental para as alterações vasculares encontradas na artéria mesentérica dos animais obesos sedentários.

*Conclusão*

## Conclusão

---

### Conclusão

O modelo de obesidade desenvolvido nesse trabalho possibilitou o estudo das alterações vasculares induzidas pelo acúmulo de tecido adiposo, sem a interferência de outras condições patológicas associadas, como resistência à insulina e hipertensão, que também interferem na função vascular. Podemos concluir, com os resultados obtidos nesse trabalho, que o acúmulo excessivo de tecido adiposo foi acompanhado por um processo inflamatório que alterou diferentemente os depósitos de gordura analisados, sendo que o tecido adiposo perivascular da aorta foi o menos susceptível à alteração do perfil de secreção de citocinas.

A alteração da função vascular, tanto da aorta quanto da artéria mesentérica, relacionou-se às modificações induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias advindas do tecido adiposo adjacente e da corrente sanguínea. Essas citocinas levaram à ativação da via do TNF $\alpha$ /receptor-1 do TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B, com conseqüente expressão dos genes alvos dessa via, como a iNOS e a COX-2. No entanto, o tipo de alteração provocada é diferente dependendo do vaso estudado. Na aorta, a ativação desta via levou ao aumento da expressão da iNOS, da produção de NO e conseqüente diminuição de contração. Na artéria mesentérica, a ativação da via TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B levou ao aumento da expressão da COX-2, ativando a via do receptor TP que induz aumento de contração. Na aorta, não existe disfunção endotelial nos animais obesos, enquanto que na artéria mesentérica existe diminuição da resposta relaxante induzida pela acetilcolina.

O treinamento físico foi capaz de prevenir a instalação da disfunção contrátil e endotelial na artéria mesentérica e de melhorar parâmetros metabólicos, provavelmente, por diminuir o estado pró-inflamatório encontrado nos animais obesos. Portanto, o exercício físico regular, pode proteger o sistema vascular contra os danos gerados pela obesidade.

# *Referências*

# Referências

---

## Referências

1. Sivitz, W.I., et al., *Obesity impairs vascular relaxation in human subjects: hyperglycemia exaggerates adrenergic vasoconstriction arterial dysfunction in obesity and diabetes*. J Diabetes Complications, 2007. 21(3): p. 149-57.
2. Hu, Z.P., et al., *Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF-kappaB system in high-fat-fed rabbits*. J Pineal Res. 2013. 55(4): p. 388-98.
3. Stapleton, P.A., et al., *Obesity and vascular dysfunction*. Pathophysiology, 2008. 15(2): p. 79-89.
4. Kawano, N., et al., *Association of endothelial and vascular smooth muscle dysfunction with cardiovascular risk factors, vascular complications, and subclinical carotid atherosclerosis in type 2 diabetic patients*. J Atheroscler Thromb. 2011. 19(3): p. 276-84.
5. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds*. Circ Res, 2007. 100(2): p. 174-90.
6. Aird, W.C., *Endothelium as an organ system*. Crit Care Med, 2004. 32(5 Suppl): p. S271-9.
7. Zhou, M.S., et al., *Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure*. Hypertension, 2006. 47(1): p. 81-6.
8. Curi, J.P.d.A.F.R., *Fisiologia Básica*. 1ª ed. 2009: Editora Guanabara Koogan LTDA.
9. Neves, M.F., et al., *Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension*. Int J Hypertens. 2012: p. 187526.
10. Arthur C. Guyton, J.E.H., *Tratado de Fisiologia Médica*. tradução da 11ª ed. 2006: Saunders/Elsevier.
11. Oliver, J.M., et al., *Pulmonary hypertension in young adults with repaired coarctation of the aorta: an unrecognised factor associated with premature mortality and heart failure*. Int J Cardiol. 2014. 174(2): p. 324-9.
12. Hashimoto, J. and S. Ito, *Aortic stiffness determines diastolic blood flow reversal in the descending thoracic aorta: potential implication for retrograde embolic stroke in hypertension*. Hypertension. 2013. 62(3): p. 542-9.
13. Blough, E.R., et al., *Aging alters mechanical and contractile properties of the Fisher 344/Nnia X Norway/Binia rat aorta*. Biogerontology, 2007. 8(3): p. 303-13.

## Referências

---

14. Chen, J.Y., et al., *Increased aortic stiffness and attenuated lysyl oxidase activity in obesity*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013. 33(4): p. 839-46.
15. Hodnett, B.L. and R.L. Hester, *Regulation of muscle blood flow in obesity*. *Microcirculation*, 2007. 14(4-5): p. 273-88.
16. Vaucher, E., et al., *GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow*. *J Comp Neurol*, 2000. 421(2): p. 161-71.
17. (WHO), W.H.O., *A global brief on Hypertension - Silent killer, global public health crisis*, W.H.O. (WHO), Editor. 2013, World Health Organization (WHO) Geneva / Switzerland
18. Cau, S.B. and R.C. Tostes, *Inducible nitric oxide synthase inhibition as a target for the treatment of vascular dysfunction in hypertension*. *Hypertension*. 2012. 59(3): p. e21.
19. de Jongh, R.T., et al., *Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance*. *Circulation*, 2004. 109(21): p. 2529-35.
20. Rath, G., et al., *Morphology and morphometric analysis of stromal capillaries in full term human placental villi of smoking mothers: an electron microscopic study*. *Clin Ter*. 2011. 162(4): p. 301-5.
21. Ooue, A., et al., *Superficial venous vascular response of the resting limb during static exercise and postexercise muscle ischemia*. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013. 38(9): p. 941-6.
22. Nicolaides, A.N., *Investigation of chronic venous insufficiency: A consensus statement (France, March 5-9, 1997)*. *Circulation*, 2000. 102(20): p. E126-63.
23. Mendizabal, Y., S. Llorens, and E. Nava, *Reactivity of the aorta and mesenteric resistance arteries from the obese spontaneously hypertensive rat: effects of glitazones*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011. 301(4): p. H1319-30.
24. Taguchi, K., et al., *Akt/eNOS pathway activation in endothelium-dependent relaxation is preserved in aortas from female, but not from male, type 2 diabetic mice*. *Pharmacol Res*. 2011. 65(1): p. 56-65.
25. Aird, W.C., *Endothelium in health and disease*. *Pharmacol Rep*, 2008. 60(1): p. 139-43.
26. Griffith, T.M., A.T. Chaytor, and D.H. Edwards, *The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization*. *Pharmacol Res*, 2004. 49(6): p. 551-64.

## Referências

---

27. Moncada, S., et al., *Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium.* Thromb Res, 1977. 11(3): p. 323-44.
28. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature, 1980. 288(5789): p. 373-6.
29. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(24): p. 9265-9.
30. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.* Nature, 1987. 327(6122): p. 524-6.
31. Arnold, W.P., et al., *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(8): p. 3203-7.
32. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator.* Hypertension, 1988. 12(4): p. 365-72.
33. Bouallegue, A., G.B. Daou, and A.K. Srivastava, *Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 in vascular smooth muscle cells by a cGMP-dependent pathway.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 293(4): p. H2072-9.
34. Aires, R.D., et al., *Paraquat poisoning induces TNF-alpha-dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats.* PLoS One. 2013. 8(9): p. e73562.
35. Garland, C.J., C.R. Hiley, and K.A. Dora, *EDHF: spreading the influence of the endothelium.* Br J Pharmacol. 2010. 164(3): p. 839-52.
36. Shimokawa, H., *Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor.* Pflugers Arch. 2010. 459(6): p. 915-22.
37. White, R. and C.R. Hiley, *A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery.* Br J Pharmacol, 1997. 122(8): p. 1573-84.
38. Fisslthaler, B., I. Fleming, and R. Busse, *EDHF: a cytochrome P450 metabolite in coronary arteries.* Semin Perinatol, 2000. 24(1): p. 15-9.
39. de Wit, C. and S.E. Wolfle, *EDHF and gap junctions: important regulators of vascular tone within the microcirculation.* Curr Pharm Biotechnol, 2007. 8(1): p. 11-25.



## Referências

---

40. Price, D.T. and J. Loscalzo, *Cellular adhesion molecules and atherogenesis*. Am J Med, 1999. 107(1): p. 85-97.
41. Feletou, M., Y. Huang, and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products*. Br J Pharmacol. 2011. 164(3): p. 894-912.
42. Levin, E.R., *Endothelins*. N Engl J Med, 1995. 333(6): p. 356-63.
43. Akata, T., *Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and the Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of vascular tone*. J Anesth, 2007. 21(2): p. 220-31.
44. Ogut, O. and F.V. Brozovich, *Regulation of force in vascular smooth muscle*. J Mol Cell Cardiol, 2003. 35(4): p. 347-55.
45. Silva, B.R.B., L. M., *Sinalização de Ca<sup>2+</sup> na contração celular in Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares*, R.R. Resende, Guatimosim, S.; Leite, M. F., Editor. 2012, SARVIER, 2012: São Paulo.
46. Akata, T., *Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca<sup>2+</sup> mobilization and/or myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity in vascular smooth muscle cells*. J Anesth, 2007. 21(2): p. 232-42.
47. Karaki, H., et al., *Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle*. Pharmacol Rev, 1997. 49(2): p. 157-230.
48. Sobey, C.G., *Potassium channel function in vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. 21(1): p. 28-38.
49. Gao, Y., *The multiple actions of NO*. Pflugers Arch. 2009. 459(6): p. 829-39.
50. Li, J., et al., *Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension*. Eur J Pharmacol, 2007. 557(2-3): p. 186-94.
51. Cho, Y.E., et al., *Enhanced contractility and myosin phosphorylation induced by Ca<sup>2+</sup>-independent MLCK activity in hypertensive rats*. Cardiovasc Res. 2011. 91(1): p. 162-70.
52. Callera, G.E., et al., *Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. 309(3): p. 1036-42.
53. Kagota, S., et al., *Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome*. Life Sci, 2006. 78(11): p. 1187-96.

## Referências

---

54. Nishimatsu, H., et al., *Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. 288(4): p. H1770-6.
55. Szucs, G., et al., *Endothelial dysfunction precedes atherosclerosis in systemic sclerosis--relevance for prevention of vascular complications*. Rheumatology (Oxford), 2007. 46(5): p. 759-62.
56. Zhou, L. and D.Y. Zhu, *Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications*. Nitric Oxide, 2009. 20(4): p. 223-30.
57. Ally, A., S.M. Nauli, and T.J. Maher, *Molecular changes in nNOS protein expression within the ventrolateral medulla following transient focal ischemia affect cardiovascular functions*. Brain Res, 2005. 1055(1-2): p. 73-82.
58. Khan, B.V., et al., *Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(17): p. 9114-9.
59. Pantopoulos, K. and M.W. Hentze, *Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(5): p. 1267-71.
60. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. 87(1): p. 315-424.
61. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J. 2011. 33(7): p. 829-37, 837a-837d.
62. Stuehr, D., S. Pou, and G.M. Rosen, *Oxygen reduction by nitric-oxide synthases*. J Biol Chem, 2001. 276(18): p. 14533-6.
63. Stuehr, D.J., et al., *Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases*. J Biol Chem, 2004. 279(35): p. 36167-70.
64. Fleming, I., *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. Pflugers Arch. 2009. 459(6): p. 793-806.
65. Pautz, A., et al., *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. Nitric Oxide. 2010. 23(2): p. 75-93.
66. Oliveira-Paula, G.H., R. Lacchini, and J.E. Tanus-Santos, *Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension*. Curr Drug Targets. 2013. 15(2): p. 164-74.

## Referências

---

67. Capettini, L.S., et al., *Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 295(6): p. H2503-11.
68. Sanchez, A., et al., *Altered arachidonic acid metabolism via COX-1 and COX-2 contributes to the endothelial dysfunction of penile arteries from obese Zucker rats*. Br J Pharmacol. 2010. 159(3): p. 604-16.
69. Vessieres, E., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition restored endothelium-mediated relaxation in old obese zucker rat mesenteric arteries*. Front Physiol. 2010. 1: p. 145.
70. Feletou, M., Y. Huang, and P.M. Vanhoutte, *Vasoconstrictor prostanoids*. Pflugers Arch. 2010. 459(6): p. 941-50.
71. Feletou, M., et al., *TP receptors and oxidative stress hand in hand from endothelial dysfunction to atherosclerosis*. 2010. Adv Pharmacol. 60: p. 85-106.
72. Morita, I., *Distinct functions of COX-1 and COX-2*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 165-75.
73. Tang, E.H. and P.M. Vanhoutte, *Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension*. Physiol Genomics, 2008. 32(3): p. 409-18.
74. WHO, *WHO Obesity and overweigh*. 2015.
75. IBGE, *POF 2008-2009: Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil 2010*.
76. Melo, M.E.d., *CUSTOS DA OBESIDADE NO BRASIL E NO MUNDO*. 2011, Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica ABESO.
77. Gao, Y.J., et al., *Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide*. Br J Pharmacol, 2007. 151(3): p. 323-31.
78. Ketonen, J., et al., *Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice*. Circ J. 2010. 74(7): p. 1479-87.
79. Leung, Y.M. and C.Y. Kwan, *Dual vascular effects of leptin via endothelium: hypothesis and perspective*. Chin J Physiol, 2008. 51(1): p. 1-6.
80. Beltowski, J., *Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension*. J Hypertens, 2006. 24(5): p. 789-801.

## Referências

---

81. Chen, H., et al., *Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2003. 278(45): p. 45021-6.
82. Fesus, G., et al., *Adiponectin is a novel humoral vasodilator*. Cardiovasc Res, 2007. 75(4): p. 719-27.
83. Zraika, S., et al., *Effects of free fatty acids on insulin secretion in obesity*. Obes Rev, 2002. 3(2): p. 103-12.
84. Jonk, A.M., et al., *Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension*. Physiology (Bethesda), 2007. 22: p. 252-60.
85. Rasouli, N., et al., *Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome*. Diabetes Obes Metab, 2007. 9(1): p. 1-10.
86. Zecchin, H.G., et al., *Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats*. Diabetes, 2007. 56(4): p. 1014-24.
87. Apovian, C.M., et al., *Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28(9): p. 1654-9.
88. Muniyappa, R., et al., *Cardiovascular actions of insulin*. Endocr Rev, 2007. 28(5): p. 463-91.
89. Lohn, M., et al., *Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor*. FASEB J, 2002. 16(9): p. 1057-63.
90. Sharma, V., et al., *Metoprolol improves cardiac function and modulates cardiac metabolism in the streptozotocin-diabetic rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. 294(4): p. H1609-20.
91. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb. 2010. 17(4): p. 332-41.
92. Dandona, P., A. Aljada, and A. Bandyopadhyay, *Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes*. Trends Immunol, 2004. 25(1): p. 4-7.
93. Hajer, G.R., T.W. van Haeften, and F.L. Visseren, *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases*. Eur Heart J, 2008. 29(24): p. 2959-71.
94. Taddei, S., et al., *Endothelial dysfunction in hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. 38 Suppl 2: p. S11-4.
95. Chadha, P.S., et al., *Obesity up-regulates intermediate conductance calcium-activated potassium channels and myoendothelial gap junctions to maintain endothelial vasodilator function*. J Pharmacol Exp Ther. 2010. 335(2): p. 284-93.

## Referências

---

96. Roberts, C.K., et al., *A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression*. J Appl Physiol (1985), 2005. 98(1): p. 203-10.
97. Singhal, A., et al., *Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease?* Circulation, 2002. 106(15): p. 1919-24.
98. Rodriguez, A., et al., *The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism*. Endocrinology, 2007. 148(1): p. 324-31.
99. Myers, J., *Cardiology patient pages. Exercise and cardiovascular health*. Circulation, 2003. 107(1): p. e2-5.
100. Meissner, M., et al., *Exercise enhances whole-body cholesterol turnover in mice*. Med Sci Sports Exerc. 2010. 42(8): p. 1460-8.
101. Suvorava, T., N. Lauer, and G. Kojda, *Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice*. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(6): p. 1320-7.
102. Hambrecht, R., et al., *Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2003. 107(25): p. 3152-8.
103. Arvola, P., et al., *Exercise enhances vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension*. Cardiovasc Res, 1999. 43(4): p. 992-1002.
104. Young, C.G., et al., *Differential effects of exercise on aortic mitochondria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. 288(4): p. H1683-9.
105. Rush, J.W., J.R. Turk, and M.H. Laughlin, *Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 284(4): p. H1378-87.
106. Farias, J.M., et al., *Exercise training performed simultaneously to a high-fat diet reduces the degree of insulin resistance and improves adipoR1-2/APPL1 protein levels in mice*. Lipids Health Dis. 2012. 11: p. 134.
107. de Queiroz, K.B., et al., *Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet*. Nutr Res. 2012. 32(9): p. 709-17.
108. Heled, Y., et al., *Physical exercise increases the expression of TNFalpha and GLUT 1 in muscle tissue of diabetes prone Psammomys obesus*. Life Sci, 2005. 77(23): p. 2977-85.
109. Sheibani, S., P. Hanachi, and M.A. Refahiat, *Effect of Aerobic Exercise on Serum Concentration of Apelin, TNFalpha and Insulin in Obese Women*. Iran J Basic Med Sci. 2013. 15(6): p. 1196-201.

## Referências

---

110. Zhang, H. and C. Zhang, *Vasoprotection by dietary supplements and exercise: role of TNF $\alpha$  signaling*. Exp Diabetes Res. 2012: p. 972679.
111. Naderali, E.K., et al., *Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols*. Clin Sci (Lond), 2001. 101(5): p. 499-506.
112. de Lima, D.C., et al., *The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex*. Metab Brain Dis, 2008. 23(4): p. 361-73.
113. Rolim, N.P., et al., *Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure*. Physiol Genomics, 2007. 29(3): p. 246-52.
114. Soares, D.D., et al., *Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 2003. 74(2): p. 357-62.
115. Nunes-Silva, A., et al., *Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study*. PLoS One. 2014. 9(5): p. e96464.
116. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, *Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge*. Clin Chem, 1972. 18(6): p. 499-502.
117. Silva, G.C., et al., *Hancornia speciosa Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO*. Journal of Ethnopharmacology. 2011. 137(1): p. 709-13.
118. Rezende, B.A., V.S. Lemos, and S.F. Cortes, *Activation of nitric oxide modulator effect by isometric contraction in rat resistance arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. 47(1): p. 51-4.
119. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. 72: p. 248-54.
120. Misko, T.P., et al., *A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples*. Analytical Biochemistry, 1993. 214(1): p. 11-6.
121. Davel, A.P., et al., *Enhanced endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary artery following beta-adrenergic overstimulation: Involvement of the NO/cGMP/VASP pathway*. Life Sci. 2015. 125: p. 49-56.
122. Lee, B.C. and J. Lee, *Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance*. Biochim Biophys Acta. 2013. 1842(3): p. 446-62.

## Referências

---

123. Li, W., et al., *Blocking the function of inflammatory cytokines and mediators by using IL-10 and TGF-beta: a potential biological immunotherapy for intervertebral disc degeneration in a beagle model*. Int J Mol Sci. 2014. 15(10): p. 17270-83.
124. Andreozzi, F., et al., *Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway, promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells*. Mol Cell Biol, 2007. 27(6): p. 2372-83.
125. Chida, D., et al., *Combined interleukin-6 and interleukin-1 deficiency causes obesity in young mice*. Diabetes, 2006. 55(4): p. 971-7.
126. Park, A., W.K. Kim, and K.H. Bae, *Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells. 2014. 6(1): p. 33-42.
127. Margareto, J., A. Marti, and J.A. Martinez, *Changes in UCP mRNA expression levels in brown adipose tissue and skeletal muscle after feeding a high-energy diet and relationships with leptin, glucose and PPARgamma*. J Nutr Biochem, 2001. 12(3): p. 130-137.
128. Chatterjee, T.K., et al., *Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding*. Circ Res, 2009. 104(4): p. 541-9.
129. Jiang, Y., et al., *Etanercept restores normal insulin signal transduction in beta2-adrenergic receptor knockout mice*. J Neuroinflammation. 2014. 11: p. 137.
130. Chinen, I., et al., *Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats*. Endocrinology, 2007. 148(1): p. 160-5.
131. Figarola, J.L., et al., *COH-SR4 reduces body weight, improves glycemic control and prevents hepatic steatosis in high fat diet-induced obese mice*. PLoS One. 2014. 8(12): p. e83801.
132. Hartvigsen, K., et al., *A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. 27(4): p. 878-85.
133. Fatani, S., et al., *Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study*. Nutr Metab (Lond), 2007. 4: p. 15.
134. Tillman, E.J., et al., *Three months of high-fructose feeding fails to induce excessive weight gain or leptin resistance in mice*. PLoS One. 2014. 9(9): p. e107206.

## Referências

---

135. Mundy, A.L., et al., *Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity*. Cardiovasc Res, 2007. 73(2): p. 368-75.
136. Baynard, T., et al., *Exercise training effects on inflammatory gene expression in white adipose tissue of young mice*. Mediators Inflamm. 2012: p. 767953.
137. Tall, A.R. and L. Yvan-Charvet, *Cholesterol, inflammation and innate immunity*. Nat Rev Immunol. 2015. 15(2): p. 104-16.
138. Kemmler, W., et al., *High versus moderate intensity running exercise to impact cardiometabolic risk factors: the randomized controlled RUSH-study*. Biomed Res Int. 2014: p. 843095.
139. Kojda, G. and R. Hambrecht, *Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy?* Cardiovasc Res, 2005. 67(2): p. 187-97.
140. Marinho, R., et al., *Endurance exercise training increases APPL1 expression and improves insulin signaling in the hepatic tissue of diet-induced obese mice, independently of weight loss*. J Cell Physiol. 2011. 227(7): p. 2917-26.
141. Linden, M.A., et al., *Moderate exercise training provides modest protection against adipose tissue inflammatory gene expression in response to high-fat feeding*. Physiol Rep. 2014. 2014 Jul 16;2(7).
142. Lund, J., et al., *Exercise training promotes cardioprotection through oxygen-sparing action in high-fat fed mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol: 2015 Apr 15;308(8):H823-9.
143. Arkan, M.C., et al., *IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance*. Nat Med, 2005. 11(2): p. 191-8.
144. Ropelle, E.R., et al., *IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition*. PLoS Biol. 2010. 8(8).
145. Noronha, B.T., et al., *Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity*. Diabetes, 2005. 54(4): p. 1082-9.
146. Fernandez-Alfonso, M.S., et al., *Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity*. Int J Endocrinol. 2013: p. 402053.
147. Calvert, J.W., et al., *Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols*. Circ Res. 2011. 108(12): p. 1448-58.
148. Araujo, H.N., et al., *Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats*. Life Sci. 2015. 125: p. 79-87.



## Referências

---

149. Kobayasi, R., et al., *Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice*. J Hypertens. 2010. 28(10): p. 2111-9.
150. Smith, C.J., et al., *Upregulation of inducible nitric oxide synthase contributes to attenuated cutaneous vasodilation in essential hypertensive humans*. Hypertension. 2011. 58(5): p. 935-42.
151. Dunn, J., et al., *S-nitrosation of arginase 1 requires direct interaction with inducible nitric oxide synthase*. Mol Cell Biochem. 2011. 355(1-2): p. 83-9.
152. Silva, G.C., et al., *Mechanism of the antihypertensive and vasorelaxant effects of the flavonoid tiliroside in resistance arteries*. Planta Med. 2013. 79(12): p. 1003-8.
153. Jin, X., et al., *Endothelial modulation of agonist-induced vasoconstriction in mesenteric microcirculation*. Yakugaku Zasshi. 2010. 130(5): p. 723-8.
154. Tsatsanis, C., et al., *Signalling networks regulating cyclooxygenase-2*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. 38(10): p. 1654-61.
155. Perez-Sala, D. and S. Lamas, *Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells*. Antioxid Redox Signal, 2001. 3(2): p. 231-48.