

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES
EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA PALATÁVEL: PAPEL DA
LEPTINA**

Josiane Fernandes da Silva

Belo Horizonte

2011

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES VASCULARES EM MODELO DE OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA PALATÁVEL: PAPEL DA LEPTINA

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Virgínia Soares Lemos

Co-orientador: Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2011

**Dedico este trabalho a Deus,
que me deu tudo que tive e tenho.**

- AGRADECIMENTOS -

- ✓ À professora Virgínia, minha orientadora, por me aceitar no laboratório e dedicar um tempo precioso para discussões e orientações nesse trabalho, pelos ensinamentos e sem dúvida, pelo convívio que me fez aprender muito;
- ✓ Ao Luciano, à Grazielle, ao Bruno, à Virgínia e ao Thiago que se tornaram pessoas importantes na minha vida profissional e pessoal, muito obrigada pelas conversas, discussões de resultados e pelo café.
- ✓ Ao José Felipe, à Rosária, à Aline, à Vânia e a todos os colegas e amigos do laboratório pelos conselhos, pelo auxílio nas discussões e nos experimentos, enfim, por tudo;
- ✓ Ao Denis, Silvia, Carol, Letícia, Júlia, Alvarina, Afonso, Mariana e Betinha pela ajuda e pelo convívio;
- ✓ Aos professores Steyner França Côrtes, do departamento de Farmacologia, e Cândido Celso Coimbra, do departamento de Fisiologia, pelo auxílio e apoio nas discussões dos resultados;
- ✓ Ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia que possibilitou a realização desse projeto;
- ✓ A minha mãe e irmãs, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis;
- ✓ A CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo auxílio financeiro.

**“Andei por esta terra durante ‘30 anos’ e, por gratidão, quero deixar
alguma lembrança”. *Vincent Van Gogh***

RESUMO

A obesidade resulta da interação entre vários fatores genéticos e ambientais, sendo freqüentemente associada com distúrbios metabólicos e alterações vasculares. Atualmente, o tecido adiposo é reconhecido como órgão endócrino, devido à produção de muitas substâncias biologicamente ativas, como as adipocinas e citocinas. A síntese de adipocinas vasoativas, pode ser a base das alterações de função vascular na obesidade. A leptina é uma adipocina que entre outros efeitos exerce influências sobre o sistema cardiovascular. Ela é capaz de modular o tônus vascular, aumentando a expressão e atividade da eNOS em alguns leitos. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações vasculares em um modelo de obesidade induzida por uma dieta palatável (constituída por 33% de ração controle, 33% de leite condensado, 27% água e 7% açúcar) e o papel da leptina nessas alterações.

Ratos (4 semanas de vida) alimentados com a dieta palatável (por 5 semanas) (D) comparados aos animais controle (C) apresentaram um maior ganho de peso corporal (C= 193.4 ± 9.6; D=247.5 ± 10.5 g; p<0,001) e acúmulo de gordura retroperitoneal (C=0.9 ± 0.1; D=1.9 ± 0.13 g/100g; p<0,0001) e epididimal (C=0.82 ± 0.06; D=1.56 ± 0.10 g/100g p <0,0001). Esses resultados mostram que a dieta enriquecida com leite condensado foi eficaz em induzir obesidade nos animais tratados, dados esses suportados pelo cálculo de eficiência alimentar e pelo índice de Lee, que foram significativamente maiores nos animais obesos, sugerindo que a dieta favoreceu o estoque de nutrientes.

Os animais obesos mostraram uma melhor resposta vasorelaxante à acetilcolina (p<0,05). Além disso, apresentaram uma menor resposta contrátil à fenilefrina (p<0,001). Essa hiporeatividade foi revertida pela remoção do endotélio, pela inibição não-seletiva da óxido nítrico sintase (NOS) com L-NAME (300 µM), e pela inibição seletiva da eNOS com L-NNA (1 µM), mas não foi alterada pela inibição da iNOS com 1400w (5µM). A produção de NO basal e estimulada com acetilcolina foi significativamente maior nos animais obesos (p<0,05). Os experimentos de Western blot mostraram níveis aumentados de expressão da eNOS, mas não da iNOS. As concentrações plasmáticas de leptina estavam aumentadas nos animais obesos (C=1,15 ± 0,02; D=1,99 ± 0,23 ng/ml p<0,01). Semelhantes aos animais tratados com a dieta, anéis de aorta de animais controles, pré-incubados com leptina 1µM por seis horas, mostraram uma contração reduzida em resposta à fenilefrina (p<0,01) e uma maior resposta vasodilatadora à ACh (p<0,05). A leptina também induziu um aumento da produção do NO que foi abolido pela inibição da eNOS com L-NNA (1 µM).

O conjunto dos nossos dados mostra a existência de uma alteração vascular nos animais obesos caracterizada, principalmente, por uma diminuição da resposta contrátil. Esta diminuição de contratilidade é, provavelmente, consequência de uma produção de NO maior, devido a um aumento da expressão de eNOS, estimulada pelo aumento nos níveis de leptina nos animais obesos, visto que o tratamento com a leptina mimetizou os efeitos da dieta.

Palavras chaves: alteração vascular, obesidade, leptina, eNOS

ABSTRACT

Obesity results from the interaction among several genetic and environmental factors, and is frequently associated with metabolic disorders and vascular changes. Currently, adipose tissue is known as an endocrine organ, due to the production of several biologically active substances, such as adipokines and cytokines. Synthesis of vasoactive adipokines may be the base of changes in vascular function regarding obesity. Leptin is an adipokine which, among other things, influences the cardiovascular system. It is able to modulate the vascular tonus, increasing the expression and activity of eNOS (endothelial nitric oxide synthase) in some vascular beds. The purpose of this study was to investigate vascular changes in a model of obesity induced by a palatable diet and the role of leptin in these changes.

Rats (4 weeks of age) fed with the diet (D) (to 5 weeks) compared with control animals (C) presented a greater body weight gain (C= 193.4 ± 9.6; D=247.5 ± 10.5 g; p<0.001) and retroperitoneal (C=0.9 ± 0.1; D=1.9 ± 0.13 g/100g; p<0,0001) and epididymal fat accumulations (C=0.82 ± 0.06; D=1.56 ± 0.10 g/100g p <0,0001). These results have shown that a diet enriched with condensed milk was able to induce obesity in the treated animals. These data are supported by the calculus of alimentary effectiveness and Lee index, which were significantly higher in obese animals, suggesting that the diet favored nutrient stock.

Obese animals have shown a better vasorelaxant response to acetylcholine (ACh) (p<0.05). In addition, they presented a lower contractile response to phenylephrine (p<0.001). This hyporeactivity was reverted by removing the endothelium and by non-selectively inhibiting nitric oxide synthase (NOS) with L-NAME (300 µM), and by selectively inhibiting eNOS with L-NNA (1 µM), but was not changed by inhibiting inducible nitric oxide synthase (iNOS) with 1400w (5µM). Basal nitric oxide (NO) production and stimulated by acetylcholine was significantly larger in obese animals (p<0.05). Western blot experiments have shown increased levels of eNOS expression, but not iNOS. Plasma concentrations of leptin were increased in obese animals (C=1.15 ± 0.02; D=1.99 ± 0.23 ng/ml p<0.01). Aortic rings from control animals, pre-incubated with leptin 1µM for six hours, have shown a reduced contraction in response to phenylephrine (p<0.01) and a higher vasodilator response to ACh (p<0.05), similar to obese animals. Leptin has also induced an increased NO production which was abolished by eNOS inhibition with L-NNA (1 µM).

Taken together, our data suggest that there is a vascular change in obese animals characterized, mainly, by a reduction in the contractile response. This reduction in

contractile response is probably a consequence of a larger NO production, due to an increase in the eNOS expression, stimulated by the increased leptin levels in obese animals, because treatment with leptin mimicked the effects of diet.

Keywords: vascular alteration, obesity, leptin, eNOS

- Lista de Abreviações e Símbolos -

ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
AKT/PKB	Proteína cinase B
ATP	Trifosfato de adenosine
BMI	Índice de massa corpórea
[Ca²⁺]_i	Concentração intracelular de cálcio
CaM	Calmodulina
DAF-FM DA	4-amino,5-methylamino-2',7'-difluorescein diacetate
DAN	2,3-diaminonaphtalene
dL	Decilitro
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
EPM	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mono nucleotídeo
g	Gramas
x g	Multiplicado pela força da gravidade
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
IFN_γ	Interferon gama
IgG-HRP	Imunoglobulina G conjugada a peroxidase
IL-1_β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida (<i>inductive Nitric Oxide Synthase</i>)

Kcal	Quilocalorias
Kg	Quilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster (<i>N^G-nitro-L-Arginine Methyl Ester</i>)
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina (<i>N^G-Nitro-L-Arginine</i>)
1400W	N-[[3-(aminomethyl)phenyl]methyl]-ethanimidamide, dihydrochloride
mA	miliAmper
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
mm²	Milímetro quadrado
mM	MiliMolar
mN	MiliNewton
NCX	Trocador para sódio e potássio
ηM	nanoMolar
nNOS	Isoforma neuronal da óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase
NS	sem diferença estatística
PBS	Solução tamponada de potássio (Phosphate Buffer Solution)
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGI₂	Prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilefrina
PI₃K	Fosfatidilinositol3-cinase (Phosphoinositide-3 kinase)
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PMCA	bomba Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
PVDF	Polivinilideno fluoreto (polyvinylidene fluoride)

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERCA	bomba Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS-T	Solução Tampão tris-Tween
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
Tris	[2-amino-2-(hidroximetil)propane-1,3-diol,(tris)]
V	voltagem
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
°C	Graus centígrados
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	microMolar

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
Obesidade	2
O sistema cardiovascular	3
O endotélio vascular	5
Regulação do tônus vascular	7
Óxido nítrico sintase	9
Disfunção do tecido adiposo e impacto no sistema cardiovascular	10
Leptina e endotélio	13
Modelos de obesidade	17
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS	48

I. INTRODUÇÃO

Introdução

Obesidade

O aumento da prevalência do sobrepeso e da obesidade no mundo preocupa os vários órgãos de saúde pública e justifica inúmeros projetos de pesquisas que visam à elaboração de tratamentos para a perda de peso e para as complicações advindas da obesidade como, resistência à insulina, doenças cardiovasculares como infarto, hipertensão e aterosclerose, além de certos tipos de cânceres (Organização Mundial da Saúde, 2011; Rasouli *et al.*, 2007; Rosmond, 2004).

Atualmente, muitos países como Brasil, Canadá e França, lidam com uma porcentagem de indivíduos com sobrepeso maior que 40%. Outros países, como EUA e Alemanha já possuem mais de 65% de sua população nessa classificação (WHO, 2011). Essa realidade social 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, morbidades e mortalidade (Melo, 2011).

Nesse contexto, vários trabalhos tiveram como objetivo levantar os gastos que a obesidade poderia ocasionar aos cofres públicos e, de certa forma, dar mais suporte a necessidade de evitar ou tratá-la. Tsai *et al.* (2011), em uma metanálise de bancos de dados de pesquisa, baseado em mais de 900 trabalhos até 2009, relatou que nos EUA, gasta-se com cuidados médicos direto entorno de 266 dólares a mais com indivíduos com sobrepeso, 1.723 dólares com obesos e aproximadamente 3.000 dólares com indivíduos obesos mórbidos. No Brasil, esses números são bem parecidos, e estima-se que 3,02% e 5,83% dos custos hospitalares do Sistema único de Saúde em 2001 (para homens e mulheres, respectivamente) estão relacionados ao sobrepeso e à obesidade (Sichieri *et al.*, 2007).

No último levantamento do IBGE, a situação no Brasil se tornou mais alarmante. O censo 2010 demonstrou que o número de homens com sobrepeso, acima de 20 anos, já é maior do que 50%, ou seja, quase o dobro do valor de 20 anos atrás (29,9% da população masculina). O aumento para as mulheres foi menor, mas não menos preocupante, sendo de 41,4% da população feminina em 1989, passando para 48% em 2008-2009 (Censo IBGE 2010).

Esses números não são apenas para população adulta. A obesidade infantil é outro item importante nesse censo e para os profissionais da saúde. O sobrepeso já atinge uma a cada três crianças e pode levar ao desenvolvimento precoce de várias doenças relacionadas à obesidade. Além disso, alguns trabalhos apontam que uma

Introdução

criança obesa tem maiores chances de se tornar um adulto obeso. Outros trabalhos acreditam que o sobrepeso na infância e adolescência é um poderoso preditor de efeitos adversos à saúde na vida adulta, independentemente do peso na idade adulta (WHO, 2011; Lloyd *et al.*, 2010).

Assim, sendo um quadro fisiopatológico de grande impacto tanto para saúde quanto para economia de uma população, a obesidade não pode ser negligenciada e os mecanismos e alterações que predispõem ou resultam desse quadro devem ser estudados e analisados, para que o tratamento ou a prevenção sejam mais eficazes.

O sistema cardiovascular

Como já mencionado, a obesidade se relaciona a vários tipos de doenças vasculares, sendo a disfunção endotelial um dos primeiros estágios. Assim, torna-se importante um breve relato sobre o sistema cardiovascular e seus constituintes.

O sistema cardiovascular é composto pelo coração e por uma extensa rede de vasos sanguíneos (artérias, capilares e veias), (fig.1). Ele é responsável por diversas funções como o transporte e distribuição de nutrientes, remoção de metabólitos e regulação da temperatura corpórea, oxigenação. O coração funciona como uma bomba para impulsionar o sangue, através dos vasos que se ramificam por todo o corpo (Levy *et al.*, 2004).

As grandes artérias, como a aorta, são estruturas predominantemente elásticas, e suas propriedades visco-elásticas determinam a complacência arterial, isto é, o grau de aumento do volume do sistema arterial com o aumento da pressão. Essa característica permite que o sangue ejetado do ventrículo esquerdo seja acomodado, a princípio, pela distensão da aorta, que absorve as pulsações do débito cardíaco, liberando um fluxo relativamente constante para os tecidos. Quanto maior a complacência do sistema, mais efetivamente as flutuações são amortecidas, e menores as oscilações da pressão arterial a cada batimento (Levy *et al.*, 2004; Aird, 2007b).

A avaliação experimental da funcionalidade das grandes artérias, conhecidas como vasos de condutância, permite estimar a eficiência desse leito em realizar algumas de suas funções básicas, como a resposta a alterações do fluxo sanguíneo, da pós-carga cardíaca e, principalmente, avaliar possíveis alterações morfofuncionais

Introdução

que podem relacionar-se com patologias tais como aterosclerose e falência cardíaca, devido, por exemplo, a um aumento da rigidez e espessamento da parede arterial (Gustafson, 2010).

As pequenas artérias, por outro lado, possuem uma camada muscular mais expressiva, sendo que nas arteríolas essa camada predomina. Com essa característica histológica, a partir das pequenas artérias, uma resistência moderada ao fluxo sanguíneo é oferecida chegando ao seu nível máximo nas arteríolas. Por essa razão, a queda de pressão é maior nos segmentos terminais das pequenas artérias e arteríolas (Levy *et al.*, 2004; Aird, 2007b). As pequenas artérias e arteríolas, por fornecerem resistência ao fluxo sanguíneo, auxiliam na mudança do padrão do fluxo sanguíneo de pulsátil para contínuo. Na hipertensão, o aumento do tônus vascular desses leitos, devido à diminuição de fatores relaxantes ou hiperpolarizantes derivados do endotélio ou ao aumento de fatores contrácteis, resulta no aumento da resistência vascular periférica, fator determinante da pressão arterial (Aizawa-abe *et al.*, 2000).

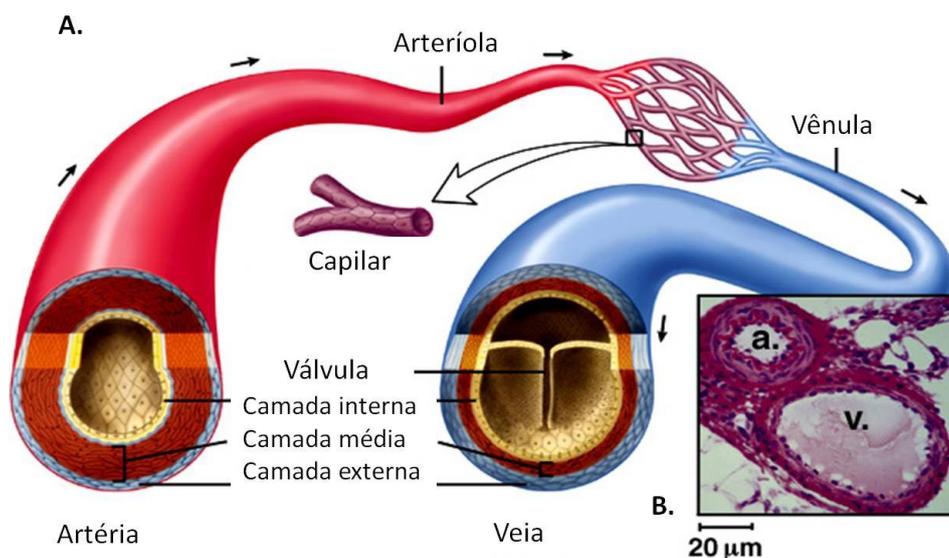


Figura 1. Vasos sanguíneos. (A) Esquema representativo da ramificação e continuidade dos vasos sanguíneos. A parede dos vasos, com exceção dos capilares, organiza-se basicamente em três camadas: a camada interna ou endotelial (túnica íntima), composta por uma camada única de células escamosas orientadas longitudinalmente; a camada média ou muscular (túnica média), formada por células musculares lisas; e a camada externa (túnica adventícia), que contém fibroblastos e fibras colágenas associadas (B) Fotomicrografia de uma arteríola e uma vênula, coloração com eosina e hematoxilina. Copyright the McGraw-Hill companies.

Cada arteríola dá origem a muitos capilares. Esses consistem de pequenos tubos com paredes de espessura de uma célula endotelial e sua camada basal. Como a área total da secção transversal do leito capilar é muito grande, a velocidade do fluxo sanguíneo torna-se muito lenta. A associação dessas duas características – espessura

Introdução

da parede e velocidade do fluxo – cria condições ideais para as trocas de substâncias entre o sangue e os tecidos.

Já as vênulas e veias são responsáveis em fazer o percurso inverso do sangue para o coração. A pressão nesses vasos decresce progressivamente e a espessura de suas paredes se modifica, aumentando a capacidade elástica. Para ajudar no retorno sanguíneo ao coração, as veias apresentam válvulas que evitam o retorno do sangue. Alterações funcionais nesses leitos estão relacionadas à retenção de sangue em membros inferiores e eventos de trombose, que podem ser agravadas com o aumento do peso corporal do indivíduo.

A camada endotelial está presente em todos os tipos de vasos citados, desde as grandes artérias e veias até aos capilares mais delgados. É uma estrutura extremamente ativa na produção de mediadores para manutenção da integridade vascular e da homeostase corporal. A disfunção vascular e mais especificamente, a disfunção endotelial, é tema de inúmeros trabalhos, visto que ela é fator determinante na gênese de várias patologias, como na hipertensão, aterosclerose e obesidade (Meyers *et al.*, 2007, Aird, 2007a,b).

O endotélio vascular

O termo endotélio foi criado por um anatomista suíço Wilhelm His, em 1865, para diferenciar o epitélio da camada interna das cavidades do corpo. Mais tarde, a definição foi restringida para incluir somente a camada de células de vasos sanguíneos e linfáticos. Com o advento da microscopia eletrônica e das técnicas de cultivo celular, o conhecimento sobre a estrutura e função das células endoteliais aumentou significativamente (Aird, 2007a).

Atualmente, a camada endotelial dos vasos é vista como uma estrutura de grande importância para a manutenção da homeostasia, exercendo funções anticoagulantes, vasodilatadoras e anti-inflamatórias (Carvalho *et al.*, 2001, Aird, 2007a,b), e não apenas agindo como uma barreira entre o sangue e os tecidos adjacentes ou controlando o transporte de substâncias entre eles.

Essa diversidade de funções está relacionada à heterogeneidade estrutural e bioquímica apresentada pelo endotélio. Por exemplo, em alguns leitos vasculares as células endoteliais são fortemente interligadas umas nas outras e possuem uma membrana basal contínua (endotélio contínuo). Um subconjunto desse grupo

Introdução

apresenta-se permeado por fenestras, sendo chamado de endotélio fenestrado. Um terceiro grupo de endotélio, endotélio descontínuo foi caracterizado pela presença de fenestra e uma membrana basal pobremente formada ou ausente (Aird, 2007a,b).

Já em relação a características bioquímicas, o endotélio expressa diferentes proteínas e marcadores, dependendo de sua localização (fig.2). Alguns genes são preferencialmente expressos em células endoteliais de artérias do que em veias. Mesmo em um único leito, por exemplo, nas veias, a proteína β -tubulina de classe III é expressa na válvula venosa, mas não na veia propriamente dita. Essa diferença pode influenciar na função endotelial e justificar diferentes respostas dessas células em condições adversas, dependendo de sua localização. Além disso, alguns trabalhos mostram uma plasticidade do endotélio, que é capaz de alterar a produção de mediadores químicos quando estimulado ou em estado patológicos (Aird, 2007 a,b).

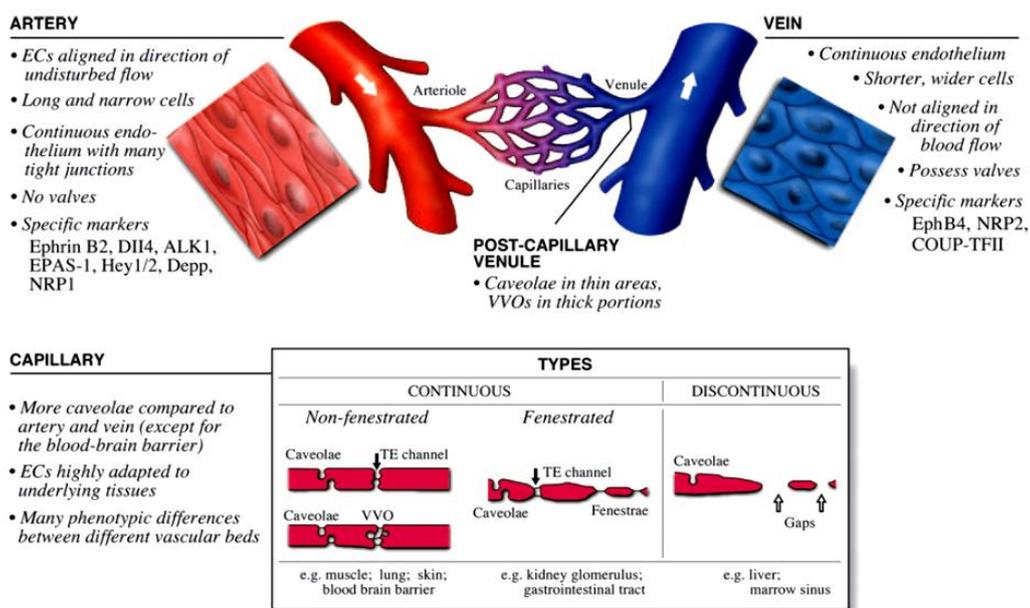


Figura 2. Diferenças fenotípicas em células endoteliais de artérias, veias, vênulas pós-capilares e capilares. Do inglês: ALK1, activin-receptor-like kinase 1; Depp, decidual protein induced by progesterone; DII4, delta-like 4; EPAS-1, endotelial PAS domain protein 1; NRP1, neuropilin 1; TE transendothelial; VVOs, vesiculo-vacuolar organelles. Esquema retirado de Aird, 2007.

Existe, em condições fisiológicas, um equilíbrio na produção dos mediadores derivados do endotélio. Dentre estes fatores, os que controlam o tônus vascular é alvo de muitos estudos, pois são capazes de induzir vasoconstrição (prostaglandina -PGG₂, endotelina, angiotensina II) ou vasodilatação (prostaglandinas PGE₂, PGI₂, óxido nítrico - NO e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio - EDHF). Além disso, um desequilíbrio desta produção pode resultar ou ser

Introdução

consequência de diversas doenças já citadas, como a hipertensão e o diabetes, caracterizando uma disfunção endotelial (Carvalho *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003).

Regulação do tônus vascular

Mudanças na concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ e o 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 $[Ca^{2+}]_i$ no músculo liso resulta, respectivamente, em contração ou relaxamento vascular. Em estado basal, o músculo liso vascular encontra-se parcialmente contraído (tônus vasomotor) sob a influência de vários tipos de sinais regulatórios, como neural, endotelial, humoral e miogênico (Akata, 2007a).

Resumidamente, após um aumento da $[Ca^{2+}]_i$, devido a mobilização desse íon dos estoques intracelular ou do influxo do meio extracelular, ele se liga a calmodulina (CaM), formando um complexo $4Ca^{2+}$ -CaM, que ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), resultando na fosforilação da cadeia leve da miosina em sítio específico, permitindo que essa clive o ATP e libere energia para interação miosina-actina, e conseqüente, contração celular (fig.3). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ocorre devido uma despolarização da membrana (por exemplo, acoplamento eletromecânico) ou a ligação de agonista contrácteis a receptores específicos da superfície celular (por exemplo, receptores α -adrenérgicos).

Por outro lado, a diminuição da $[Ca^{2+}]_i$, como resultado da captação desse íon para dentro do retículo sarcoplasmático ou pela extrusão para meio extracelular, leva a dissociação do complexo $4Ca^{2+}$ -CaM, e portanto, ao relaxamento muscular. Existem vários mecanismos que reduzem a $[Ca^{2+}]_i$, 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 (Akata, 2007b).

Os principais mecanismos mediadores da vasodilatação (fig.3) envolvem ativação de canais para K^+ e aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) (Karaki *et al.*, 1997).

Introdução

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 (Sorbey, 2001).

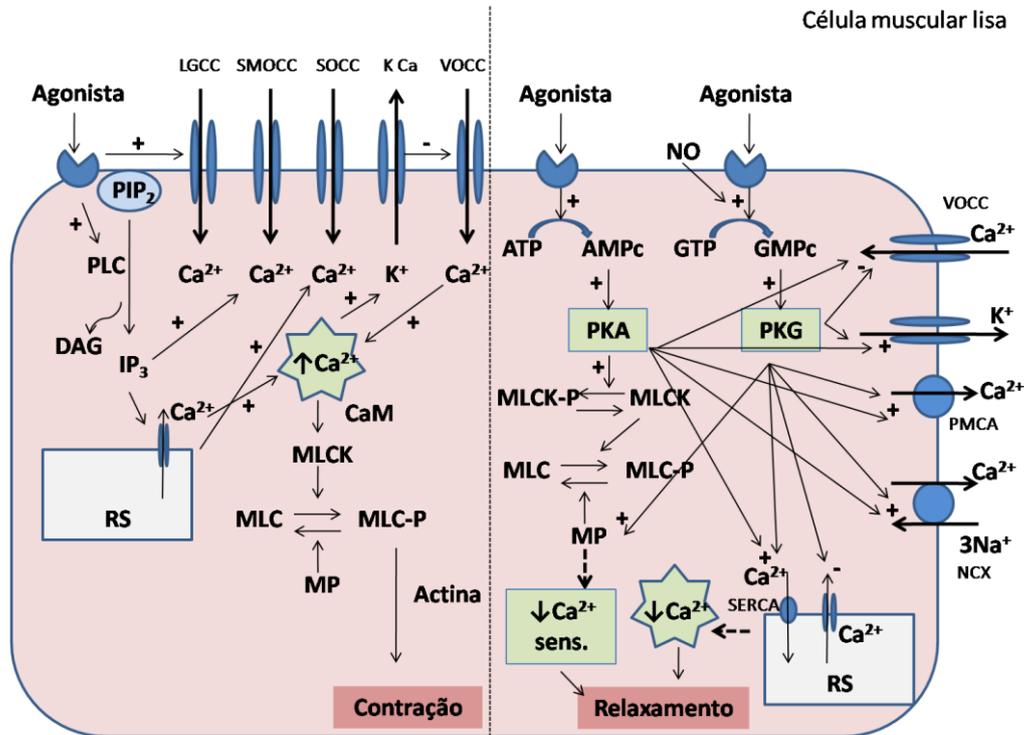


Figura 3. Mecanismos envolvidos na contração e no relaxamento do músculo liso vascular. Adaptado de Akata (2007 a, b). Legenda (itens ausentes no texto): Ca^{2+} sens., sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} ; LGCC, canais para cálcio operados por ligantes; K Ca, canais para potássio sensíveis à concentração de cálcio intracelular; MLC-P, cadeia leve de miosina fosforilada; MLCK-P, quinase da cadeia leve de miosina fosforilada; MP, miosina fosfatase; PMCA, bomba de Ca^{2+} dependente de ATP da membrana plasmática; RS, retículo sarcoplasmático; SMOCC, canais para cálcio operados por segundos mensageiros; SOCC, canais para cálcio operados pelas reservas; VOCC, canais para cálcio regulados por voltagem.

A produção de nucleotídeos cíclicos pode ser estimulada por várias substâncias vasodiladoras, através da ativação de receptores acoplados à proteína G na membrana da célula muscular lisa que ativa a enzima adenilil-ciclase, resultando na produção de cAMP a partir do ATP. No entanto, outros vasodilatadores ativam a proteína guanilil-ciclase solúvel (como o NO) ou receptores com atividade de guanilil-ciclase intrínseca (como o peptídeo natriurético atrial – ANP), levando a produção de cGMP a partir do GTP. Esses mediadores, cAMP e cGMP, através da ativação respectiva das proteínas quinases, PKA e PKG, reduzem a concentração intracelular do Ca^{2+} , por estimulação da SERCA, da PMCA, do NCX. Elas também podem ativar canais para K^+ ou diminuir a sensibilidade das proteínas contrácteis ao Ca^{2+} , por fosforilação e inativação da MLCK (via PKA) e ativação da enzima miosina fosfatase, via PKG (fig.3).

Introdução

Em condições patológicas, como na obesidade, uma das principais alterações na resposta vasomotora é a que envolve a enzima óxido nítrico sintase, podendo ser inibida e, portanto, diminuindo a produção de um importante fator relaxante, o óxido nítrico.

Óxido nítrico sintase

O óxido nítrico (NO) exerce um papel fundamental no controle do tônus muscular, como descrito acima, contrapondo as ações dos mediadores contráteis liberados pelo próprio endotélio ou advindos da circulação.

A produção fisiológica do NO é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que são amplamente expressas pelo organismo, como nas células endoteliais, nos neurônios, nas células musculares lisas e nos macrófagos. Essas enzimas pertencem a uma família de proteínas complexas que catalisam a oxidação da L-arginina para formar óxido nítrico e L-citrulina. São proteínas diméricas que contêm um grupamento heme e precisam das flavinas FAD e FMN para realização de sua função, como também, do cofator pteridina (6R)- 5,6,7,8- tetrahydro-L-biopterina (Hybiopterina), (Fleming I., 2010).

Atualmente, são conhecidas três isoformas principais, eNOS (endotelial constitutiva), nNOS (neuronal constitutiva) e iNOS (induzida).

A produção de NO, pelas células endoteliais, é realizada principalmente pela eNOS. No entanto, conforme Capettini *et al.*, 2008, a isoforma neuronal, nNOS, contribui significativamente, para manutenção do tônus vascular em camundongo.

A eNOS é uma enzima constitutiva, está ancorada à membrana da célula endotelial em sua forma nativa, em microdomínios denominados cavéolas. Quando ocorre o aumento de $[Ca^{2+}]_i$, a proteína é ativada pela associação ao complexo Ca^{2+} -Calmodulina sofrendo translocação para o citosol. A produção de NO pela eNOS também pode ser modulada pelo nível de fosforilação dessa proteína (Fleming I., 2010). Logo, essa enzima pode ser regulada por dois mecanismos principais: (1) pelo aumento de Ca^{2+} intracelular no endotélio, resultando no aumento do complexo Ca^{2+} -calmodulina que é importante para estabilização da forma dimérica da proteína; (2) por fosforilação em resíduos de serina e treonina, por mecanismos dependentes de tirosina cinase (Fleming I., 2010), que resultará na ativação ou inibição da enzima.

Introdução

A isoforma neuronal está relacionada com regulação da duração da transmissão sináptica no SNC, na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso (Ally *et al.* 2005; Capettini *et al.*, 2008). Sua atividade também é regulada pelo complexo Ca^{2+} -calmodulina e por fosforilação (Viaro *et al.*, 2000).

Já a isoforma induzida, iNOS, só é manifestada após um estímulo, como lipopolissacarídeos (LPS), citocinas ($IL-1\beta$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-6) e outros. Por estas características, tem funções primordiais em processos patológicos, inflamações, infecções e doenças auto-imunes. Apresenta uma atividade de produção de NO superior as outras isoformas e não depende do aumento da concentração intracelular de cálcio (Carvalho *et al.*, 2001; Viaro *et al.*, 2000).

Disfunção do tecido adiposo e impacto no sistema cardiovascular

A obesidade é uma doença de alta prevalência na sociedade com importantes impactos sociais, psicológicos e médicos.

A obesidade compreende um aumento do tecido adiposo relacionado a um desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (Speakman *et al.*, 2007; Kovacs *et al.*, 2006). Esse desequilíbrio pode ser justificado por inúmeros fatores, dentre eles, o aumento do consumo de dietas hipercalóricas, a falta de atividade física, fatores hormonais (síndrome de Cushing, síndrome metabólica) e fatores genéticos (Rosmond, 2004).

A suscetibilidade ao aumento do tecido adiposo, além da influência dos fatores ambientais (como sedentarismo, stress e hábitos alimentares) e todos os distúrbios associados, pode ser determinada também por fatores genéticos. Hoje, existem mais de 30 desordens gênicas que podem desencadear obesidade, mas elas são alterações raras e não servem para explicar os casos de obesidade mais comuns (Rosmond, 2004). Todavia, o fator genético na obesidade parece ser importante e esclareceria o fato de que pessoas diferentes, mas com o mesmo estilo de vida, não necessariamente apresentem o mesmo acúmulo de gordura e ganho de peso.

A obesidade hoje é uma epidemia e para facilitar o seu estudo e diagnóstico tornou-se importante o desenvolvimento de classificação de indivíduos obesos. No entanto, as classificações não são sempre seguras e nem definem se o paciente está

Introdução

ou não doente. Em muitos estudos, a classificação mais utilizada do indivíduo obeso, é feita pelo índice de massa corporal (BMI - do inglês *body mass index*), que é dado pela razão entre o peso corporal (Kg) e a altura ao quadrado (m^2), sendo indivíduos normais com BMI de 18,50 até 24,99; indivíduos com sobrepeso com BMI $\geq 25,00$, destes as pessoas entre 25,00 – 29,99 são pré-obesas e acima de 30,00 são consideradas obesas (WHO, 2011; Rasouli *et al.*, 2007). No entanto, não somente o aumento do tecido adiposo, mas também a localização dos depósitos de gordura no indivíduo obeso devem ser considerados, visto que as alterações fisiológicas decorrentes da obesidade podem ser distintas entre os indivíduos obesos. Além disso, a contraditória diminuição dos fatores de risco para doenças cardiovasculares apresentada por alguns indivíduos obesos sem outras patologias associadas levou a criação do termo “paradoxo da obesidade” por alguns pesquisadores que objetivam entender essa redução do risco nesses indivíduos (Khalangot *et al.*, 2009; Curtis *et al.*, 2005). Niraj *et al.* (2007) observaram que pacientes obesos são menos propensos a morrerem dentro de um ano por alteração anatômica da coronária, avaliado pela técnica de angiografia, suportando a idéia do paradoxo.

Baseado em algumas diferenças funcionais e morfológicas, o tecido adiposo foi dividido em dois tipos principais: o tecido adiposo branco (subdivido em visceral e subcutâneo) e o tecido adiposo marrom. Apesar desses dois tecidos apresentarem características metabólicas comuns, o tecido adiposo branco está mais relacionado ao estoque de energia, enquanto o tecido marrom dissipa energia e calor, relacionando-se com a regulação térmica (Gustafson *et al.* 2010). Além disso, muitos estudos observaram que o tecido adiposo em geral é composto por aproximadamente 50% de adipócitos e os outros 50% são células, tais como: pré-adipócitos, células vasculares, neurais, leucócitos e células do sistema imune. Dentre essas células, os adipócitos, os pré-adipócitos e os macrófagos são responsáveis pela secreção de várias citocinas (IL-6, IL-8 IL-1 β) e adipocinas (adiponectina, leptina) que atuam em vários órgãos e sistemas, influenciando e modulando sua função, como o fígado, o músculo e o sistema cardiovascular (fig.4). Por isso, recentemente, o tecido adiposo é também considerado um órgão endócrino além de sua função de estoque energético e de produção de calor (Gustafson *et al.*, 2010; Maenhaut *et al.*, 2011).

Introdução

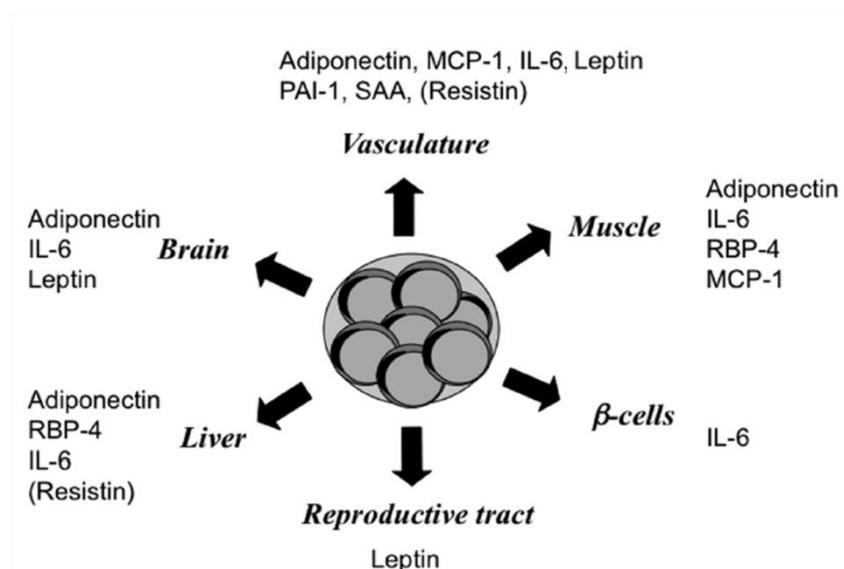


Figura 4. Interação entre tecido adiposo e outros órgãos. O tecido adiposo é um órgão endócrino chave, capaz de produzir adipocinas que afetam outros tecidos, exercendo um papel importante na fisiologia da resistência à insulina e na síndrome metabólica. Modificado de Gustafson *et al.*, 2010.

Atualmente, trabalhos demonstram que a obesidade visceral, aumento do tecido adiposo mesentérico e omental, está mais associada com a síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e resistência à insulina (Zraika *et al.*, 2002; Jonk *et al.*, 2007; Rasouli *et al.*, 2007) do que os demais depósitos de gordura. No entanto, os mecanismos envolvidos na adaptação cardiovascular fisiológica durante a instalação do quadro de obesidade, bem como das complicações relacionadas à mesma ainda não foram elucidados.

Outro argumento para que a gordura visceral seja mais prejudicial ao organismo, baseia-se na hipótese de que o seu acúmulo facilitaria o acesso de ácidos graxos, provenientes de tecido adiposo visceral, ao fígado, via veia porta (Zraika *et al.* 2002). Alguns autores consideram que o metabolismo nesse órgão pode alterar-se, levando a um aumento na produção de glicose hepática decorrente de um aumento da taxa de gliconeogênese (Zraika *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2001). Assim, associado a outras alterações, o acúmulo de gordura abdominal poderia resultar em resistência à insulina em longo prazo (Vykoukal *et al.*, 2011).

Algumas das alterações associadas ao acúmulo de gordura visceral estão relacionadas ao aumento do depósito de lipídeo em células não-adipócitas (hepatócitos, células β 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 (Rasouli *et al.*, 2007). Sharma *et al.*(2008) mostraram que o acúmulo de lipídeo no músculo cardíaco induz uma disfunção metabólica, podendo levar a resistência à insulina, prejudicando assim a oxidação de

Introdução

glicose, e conseqüentemente, resultando em falência cardíaca. Suportando 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 (Gustafson *et al.*, 2010).

As alterações decorrentes do aumento da massa do tecido adiposo são motivos de intenso estudo, tendo em vista os divergentes resultados encontrados na literatura. Por exemplo, os mecanismos envolvidos na alteração da função endotelial relacionadas à obesidade não estão bem claros, variando sua resposta quanto ao leito vascular estudado e ao modelo animal utilizado. Em algumas doenças relacionadas à obesidade, como a hipertensão, a função vascular é preservada pelo aumento na produção de EDHF em detrimento da produção do óxido nítrico (Taddei *et al.*, 2001). Chadha *et al.* 2010 mostraram que a função vascular da artéria safena foi preservada em modelo de obesidade induzida por dieta.

As alterações na produção de adipocinas bem como a idade de início do desenvolvimento da obesidade 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 assim, preservando a função vascular e sugere que, em estágios iniciais do crescimento, o organismo se adapta ao aumento da massa corpórea e conseqüente aumento do fluxo sanguíneo para esse novo tecido (Singhal *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2007).

Contribuindo para essas diferenças encontradas na literatura, a obesidade pode ser considerada um estado pró-inflamatório crônico e de baixo grau, com o aumento da produção de fatores pró-inflamatórios e alteração na produção das adipocinas, o que levaria principalmente a um aumento na concentração plasmática de leptina, um importante modulador vascular produzido pelo tecido adiposo (Gustafson *et al.*, 2010).

Leptina e endotélio

A leptina (do grego leptos = magro) foi identificada em 1994, pelo trabalho do grupo do Dr. Friedman da Rockefeller University, Nova Iorque, EUA. No entanto, essa descoberta foi possibilitada pelas investigações feitas nos modelos experimentais de obesidade, os camundongos ob^{-/-} e db^{-/-}, desde a década de 70. Nessa época, resultados obtidos com a técnica de parabiose, entre esses dois modelos genéticos e o animal selvagem, os pesquisadores sugeriram que no camundongo ob^{-/-} faltava

Introdução

um fator circulante ob (hormonal) que estava presente tanto no camundongo selvagem quanto no db^{-/-}/db^{-/-}. E ao contrário do ob^{-/-}/ob^{-/-}, o db^{-/-}/db^{-/-} não tinha seu fenótipo alterado na presença desse fator, sugerindo uma possível alteração no receptor para ob. Mas esses resultados só foram confirmados com os estudos genéticos do professor Friedman. Logo depois, em 1995, o receptor para leptina foi clonado, através de técnicas biomoleculares que utilizavam leptina marcada (Tartaglia *et al.*, 1995).

Foram identificadas múltiplas isoformas para o receptor da leptina e todas são produtos de um único gene (*lepr*), resultando de modificações no mRNA ou de processamento proteolíticos. Eles são divididos em três classes: secretados, os curtos e os receptores longos. Os primeiros são formas secretadas, que podem ser produto de clivagem das formas ligadas a membrana. Ele contém somente o domínio de ligação à leptina e forma um complexo com esse hormônio circulante, controlando sua concentração livre. As isoformas curta e longa do receptor são ligadas à membrana plasmática, diferindo no domínio intracelular do receptor, sendo a primeira constituída por 29 resíduos de aminoácidos e a última, por aproximadamente 300 resíduos. Enquanto a função da isoforma curta do receptor não é conhecida, o receptor longo é crucial para as ações da leptina. (Myers *et al.*, 2004).

Atualmente, sabe-se que a leptina é produzida primariamente pelo tecido adiposo branco e que sua secreção na circulação segue um padrão pulsátil, com um pico de secreção ocorrendo durante a noite para os humanos e que sua concentração plasmática é pouco influenciada pelas refeições (Negrão *et al.*, 2000). No entanto, os níveis de leptina refletem o estado nutricional do organismo, ou seja, as reservas energéticas do corpo. A leptina regula esse balanço energético através de processos que envolvem a redução da ingestão de alimento (induzindo um sinal de saciedade no sistema nervoso central) e o aumento do gasto metabólico, favorecendo o balanço energético negativo (Myers *et al.*, 2005; Morrison, 2008).

Além do controle dos estoques de energia, recentemente, muitos trabalhos demonstraram outras importantes ações da leptina, principalmente no sistema cardiovascular (Correia *et al.*, 2006; Maenhaut *et al.*, 2011). A leptina pode estimular a produção de óxido nítrico, de modo dependente e independente do endotélio e também estimula a produção de EDHF em artérias mesentéricas (Lembo *et al.*, 2000). Rodríguez *et al.* (2007) mostraram que a leptina diminui a resposta contrátil à angiotensina II, por aumentar a biodisponibilidade do NO. Além disso, Sahin *et al.* (2007) mostrou que a leptina é capaz de induzir relaxamento em anéis de aorta de ratos, através da produção de NO e H₂O₂ derivado do endotélio.

Introdução

Muitos trabalhos procuram demonstrar o mecanismo pelo qual a leptina induz a produção de NO, e conseqüentemente, induzir a resposta vasodilatadora. No endotélio, tem sido demonstrado que a leptina ativa a enzima eNOS, através de mecanismo dependente da proteína quinase B (PKB/Akt), mas não-dependente da ativação da proteína fosfatidilinositol 3 quinase - PI₃K (Vecchione *et al.*, 2002,2003). Procopio *et al.* (2009) conseguiram mostrar, em cultura de células endotelial de aorta humana, que esse mecanismo pode envolver a participação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK), ativando diretamente a eNOS ou através da Akt. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer a participação dessas proteínas no mecanismo de ação da leptina, o possível envolvimento de outras isoformas da NOS, a produção do EDHF e por fim, como esse mecanismo pode alterar-se em condições patológicas.

Por outro lado, vários pesquisadores mostram uma contribuição dual da leptina homeostase da pressão arterial (Correia *et al.*, 2006). Enquanto essa adipocina induz uma simpatoexcitação central, a nível periférico ela pode também promover vasodilatação por mecanismos não totalmente estabelecidos. Assim, esse comportamento dual da leptina pode ajudar a explicar o porque a obesidade não está sempre relacionada à hipertensão.

Aizawa-Abe *et al.* (2000) mostraram que animais que superexpressam leptina ou animais obesos com hiperleptinemia apresentaram aumento da pressão arterial, que foi revertida pela redução da concentração plasmática desse hormônio e por bloqueadores α_1 e β -adrenérgicos, em doses que não afetaram a pressão arterial dos animais controles. Assim, os autores sugerem que a leptina pode estar relacionada ao aumento da pressão arterial em obesos, provavelmente por estimular a liberação de catecolaminas. Outros trabalhos suportam os resultados de Aizawa-Abe, demonstrando que a leptina é capaz de estimular o sistema nervoso simpático e conseqüentemente elevar os níveis pressóricos em animais obesos (Rahmouni *et al.*, 2005; Correia *et al.*, 2006; Haynes, 2005).

Alguns autores defendem também o conceito de resistência seletiva à leptina (Correia *et al.*, 2006; Morrison *et al.*, 2008). A resistência à leptina é geralmente descrita como um estado, no qual, níveis circulantes desse hormônio estão elevados, concomitante à hiperfagia e obesidade. Pode ser definida também com a ausência de efeito na administração de leptina exógena (Morrison *et al.*, 2008). Trabalhos observaram que a hiperleptinemia crônica induz a resistência à leptina no leito vascular. Esses dados, associados a uma baixa concentração de adiponectina e alta

Introdução

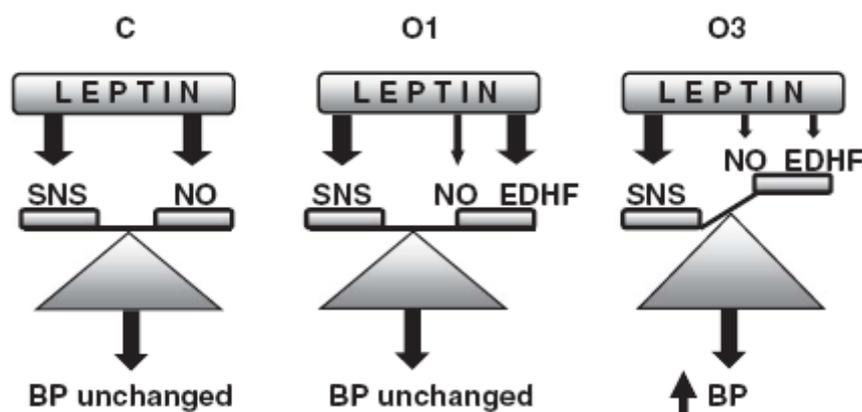


Figura 5. Papel do NO e EDHF no efeito hemodinâmico agudo da leptina. Em animais controles magros (C), a leptina ativa o sistema nervoso simpático (SNS) e a produção de NO e não induz mudança na pressão arterial (BP) dos ratos. Em animais obesos, tratados por um mês (O1) com dieta de cafeteria, o efeito da leptina na produção de NO é prejudicado, mas compensado pela produção de EDHF, por isso a pressão arterial não se altera. Finalmente, no grupo obeso tratado por três meses (O3), o efeito da leptina na produção de NO e EDHF são alterados, prevalecendo o efeito no SNS, resultando no aumento da pressão arterial. Beltowski, 2006.

concentração de $TNF\alpha$, levam a uma redução produção de óxido nítrico (NO) endotelial, devido à modulação negativa da enzima óxido nítrico sintase endotelial, e estímulo da liberação do fator contrátil endotelina-1, aumentando a resistência vascular periférica e conseqüentemente, elevando a pressão arterial (Maenhaut *et al.*, 2011; Gustafson *et al.*, 2010; Haynes *et al.*, 2005). Roberts *et al.* (2005) mostraram que o tratamento em ratos com dieta rica em gordura e açúcares (que mimetiza a dieta usada pela população ocidental) levou a diminuição da expressão e atividade da proteína óxido nítrico sintase, resultando em uma menor resposta vasodilatadora da aorta à acetilcolina, devido a diminuição da produção de NO e de fatores relaxantes derivados do endotélio vascular, predispondo os animais a hipertensão arterial e ao desenvolvimento de placa de ateroma. No entanto, essas alterações foram observadas em animais tratados por sete meses. Em outros trabalhos, nos quais o tempo de tratamento foi menor, não foi observada alteração na pressão arterial dos animais tratados (Beltowski *et al.*, 2006).

Por outro lado, o conceito de resistência seletiva baseia-se em trabalhos, nos quais os modelos experimentais apresentam uma resistência seletiva às ações metabólicas da leptina, no entanto, o efeito simpato-excitatório permanece. A capacidade de induzir a produção de NO e EDHF (fig.5) também pode está alterada (Beltowski *et al.*, 2003). Essa característica também contribui para os diferentes fenótipos apresentados pelos modelos de obesidade.

Introdução

Modelos de obesidade

Grande parte do conhecimento sobre as alterações decorrentes da obesidade foi alcançado utilizando modelos experimentais como ratos, camundongos e macacos, que desenvolviam alterações metabólicas e sistêmicas semelhantes às humanas.

São vários os modelos usados para desenvolver e estudar a obesidade (Speakman *et al.*, 2007), por exemplo, os que apresentam alterações gênicas (Rosmond *et al.*, 2004), como o rato obeso Zucker, com mutação no gene autossomo recessivo (*fa⁻/fa⁻*), codifica um receptor para leptina não-funcional. Devido ao prejuízo na via de sinalização da leptina, esses animais apresentam um reflexo de saciedade alterado, com conseqüente hiperfagia e desenvolvimento do quadro de obesidade. Apresenta também moderada hipertensão, hipertrigliceridemia, resistência à insulina, representando um modelo viável para o estudo da obesidade e doenças relacionadas. A alteração no gene *ob⁻/ob⁻*, em camundongos, que resulta em uma produção deficiente de leptina, gerou outro importante modelo para o estudo da obesidade e suas conseqüências. Esses camundongos apresentam diabetes *Mellitus* não-dependente de insulina e a obesidade é observada a partir do 28º dia depois do nascimento. Existe também o camundongo diabético (*db⁻/db⁻*), que apresenta mutação do receptor para leptina e distúrbios metabólicos, contribuindo para esclarecer as alterações presentes na diabetes associada à obesidade.

Outro tipo de modelo de obesidade, mais relacionado com o sobrepeso em humanos, é o que envolve mudanças na dieta dos animais. Os mais freqüentemente utilizados são: animais tratados com ração enriquecida em gordura (high-fat), açúcares (high-sucrose) ou ambos (Naderali *et al.* 2001, 2003), que exemplificam hábitos alimentares da sociedade ocidental, como as comidas rápidas, sanduíches, frituras, doces, etc. Esses modelos apresentam uma ampla variedade de fenótipo, dependendo do início do tratamento, da duração desse tratamento, do tipo de dieta e animal escolhido. Estas diferenças permitem o estudo dos diversos mecanismos que podem ser alterados com a obesidade e extrapolação dos resultados para o entendimento da obesidade humana.

Dentro desse contexto, apesar das inúmeras hipóteses para as possíveis causas das alterações relacionadas à obesidade citadas, não estão claros os mecanismos que as desenvolvem. Muitos estudos precisam ser realizados para entendermos os processos pelos quais essas doenças se instalam e assim, contribuir para prevenção e elaboração de tratamentos. Por isso, nesse trabalho, optamos por

Introdução

uma dieta enriquecida com leite condensado, muito bem descrita na literatura (Naderali *et al.*, 2001, 2003; Lima *et al.*, 2008), capaz de desenvolver obesidade nos animais tratados e permitir o estudo das alterações resultantes do excesso de gordura. O tratamento será realizado em animais recém-desmamados, para avaliarmos o impacto de uma dieta rica em açúcares simples, em estágios iniciais do crescimento, aumentando assim o conhecimento sobre os mecanismos que interligam a obesidade e as demais patologias relacionadas, principalmente em crianças.

2. CONCLUSÃO

Conclusão

Os nossos resultados mostram que existe um aumento da expressão da eNOS na aorta dos animais obesos com um conseqüente aumento na produção de NO. Este aumento na produção de é, provavelmente, um reflexo dos aumentos séricos de leptina produzida no tecido adiposo e leva a uma conseqüente diminuição de contratilidade da artéria aorta, bem como, uma melhoria do relaxamento vascular. Essa alteração de função vascular pode representar uma resposta fisiológica adaptativa ao aumento do fluxo sanguíneo conseqüente ao aumento da ingestão alimentar, do peso corporal e do metabolismo o que levaria a necessidade de uma adequada distribuição do fluxo sanguíneo.

3. REFERÊNCIAS

Referências

AIRD, W. C. - Phenotypic heterogeneity of the endothelium - I. Structure, Function, and Mechanisms. *Circ Res.* 100:158-173 (2007a).

AIRD, W. C. - Phenotypic heterogeneity of the endothelium - II. Representative vascular Beds. *Circ Res.* 100:174-190 (2007b).

AIZAWA-ABE, M.; OGAWA, Y.; MASUZAKI, H.; EBIHARA, K.; SATOH, N.; IWAI, H.; MATSUOKA, N.; HAYASHI, T.; HOSODA, K.; INOUE, G.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. - Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. *J. Clin. Invest.* 105:1243-1252 (2000).

AKATA, T. - Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: Basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} -dependent regulation of vascular tone. *J. Anesth.* 21: 220-231 (2007a).

AKATA, T. - Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: Regulatory mechanisms modulating Ca^{2+} mobilization and/or myofilament Ca^{2+} sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J. Anesth.* 21: 232-242 (2007b).

ALLY, A.; NAULI, S.M.; MAHER, T.J. - Molecular changes in nNOS protein expression within the ventrolateral medulla following transient focal ischemia affect cardiovascular functions. *Brain Res.* 1055(1-2):73-82 (2005).

BEŁTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A. - Stimulatory effect of leptin on nitric oxide production is impaired in dietary-induced obesity. *Obes. Res.* 11(12): 1571-80 (2003).

BEŁTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; JAMROZ-WIŚNIEWSKA, A. - Role of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the regulation of blood pressure by leptin in lean and obese rats. *Life Sci.* 79(1):63-71 (2006).

BURNEIKO, R.C.; DINIZ, Y.S.; GALHARDI, C.M.; RODRIGUES, H.G.; EBAID, G.M.; FAINE, L.A.; PADOVANI, C.R.; CICOGNA, A.C.; NOVELLI, E.L. - Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1167-1172 (2006).

CAPETTINI, L.S.; CORTES, S.F.; GOMES, M.A.; SILVA, G.A.; PESQUERO, J.L.; LOPES, M.J.; TEIXEIRA, M.M.; LEMOS, V.S. - Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(6):H2503-11 (2008).

Referências

- CAPETTINI, L.S.; CORTES, S.F.; LEMOS, V.S. - Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur. J Pharmacol.* 25; 643(2-3): 260-6 (2010).
- CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. – Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens.* 8(1): 76-88 (2001).
- CASSIS, L.A.; POLICE, S.B.; YIANNIKOURIS, F.; THATCHER, S.E. - Local Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. *Curr Hypertens Rep.* 10(2): 93–98 (2008).
- CENSO IBGE 2010 - POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1. (acesso 28/04/2011 às 11:15 am).
- CHADHA, P.S.; HADDOCK, R.E.; HOWITT, L; MORRIS, M.J.; MURPHY, T.V.; GRAYSON, T.H.; SANDOW, S.L. - Obesity up-regulates intermediate conductance calcium-activated potassium channels and myoendothelial gap junctions to maintain endothelial vasodilator function. *J Pharmacol Exp Ther.* 335(2):284-93 (2010).
- CORREIA, M.L.G.; RAHMOUNI, K. - Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab.* 8:603–610 (2006).
- CURTIS, J.P.; SELTER, J.G.; WANG, Y.; RATHORE, S.S.; JOVIN, I.S.; JADBABAIE, F.; KOSIBOROD, M.; PORTNAY, E.L.; SOKOL, S.I.; BADER, F.; KRUMHOLZ, H.M. - The obesity paradox, body mass index and outcomes in patients with heart failure. *Arch intern med.* 165(1):55-61 (2005).
- FLEMING, I.- Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Eur J Physiol.* 459:793–806 (2010).
- FUJIMOTO M, SHIMIZU N, KUNII K, MARTYN JA, UEKI K, KANEKI M.- A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes.* 54(5):1340-8 (2005).
- GUSTAFSON, B. – Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 17: 332-341 (2010).

Referências

- HARTELL, N.A.; ARCHER, H.E.; BAILEY, C.J. - Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem Pharmacol.* 69(5):781-90 (2005).
- HAYNES, W.G. - Role of leptin in obesity-related hypertension. *Exp. Physiol.* 90: 683-688 (2005).
- JONK, A.M.; HOUBEN, A.J.H.M.; JONGH, R.T. DE; SERNÉ, E.H.; SCHAPER, N.C.; STEHOUWER, C.D.A. - Microvascular Dysfunction in obesity: A potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology.* 22: 252-60 (2007).
- KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 49(2): 157-230 (1997).
- KHALANGOT, M.; TRONKO, M.; KRAVCHENKO, V.; KULCHINSKA, J.; HU, G. - Body mass index and the risk of total and cardiovascular mortality among patients with type 2 diabetes: a large prospective study in Ukraine. *Heart* 95:454-460 (2009).
- KHAZAEI, M.; MOIEN-AFSHARI, F.; LAHER, I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology.* 15 (1): 49-67 (2008).
- KOVACS, E.M.R.; MELA, D.J. - Metabolically active functional food ingredients for weight control. *Obes Rev.* 7: 59–78 (2006).
- LEMBO, G.; VECCHIONE, C.; FRATTA, L.; MARINO, G.; TRIMARCO, V.; D'AMATI, G.; TRIMARCO, B. - Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes.* 49(2):293-7 (2000).
- LEVY, M.N. O sistema arterial. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. *Fisiologia.* 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier 373-386 (2004).
- LIMA, D.C.; SILVEIRA, S.A.; HAIBARA, A.S.; COIMBRA, C.C. - The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab Brain Dis.* 23(4):361-73 (2008).
- LLOYD, L.J.; LANGLEY-EVANS, S.C.; MCMULLEN, S. - Childhood obesity and adult cardiovascular disease risk: a systematic review. *Inter. J. Obes.* 34:18–28 (2010).
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-75 (1951).

Referências

MAENHAUT, N.; VAN DE VOORDE, J. - Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med.* 16:9-25 (2011).

MELO, M.E.- CUSTOS DA OBESIDADE NO BRASIL E NO MUNDO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica – ABESO (2011).

MEYERS, M.R.; GOKCE, N. - Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 14:365–369 (2007).

MISKO, T.P.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W.M.; CURRIE, M.G. - A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem.* 214(1):11-6 (1993).

MORRISON, C.D. - Leptin resistance and the response to positive energy balance *Physiol Behav.* 94: 660–663 (2008).

MUNDY, A.L.; HAAS, E.; BHATTACHARYA, I.; WIDMER, C.C; KRETZ, M.; HOFMANN-LEHMANN, R.; MINOTTI, R.; BARTON, M. - Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res.* 73: 368–375 (2007).

MYERS, M.G. JR. - Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res.* 59:287-304 (2004).

NADERALI, E.K.; BROWN, M.J.; PICKAVANCE, L.C.; WILDING, J.P.; DOYLE, P.J.; WILLIAMS, G. - Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin Sci.* 101: 499-506 (2001).

NADERALI, E.K.; ESTADELLA, D.; ROCHA, M.; PICKAVANCE, L.C.; FATANI, S.; DENIS, R.G.P.; WILLIAMS, G. - A fat-enriched, glucose-enriched diet markedly attenuates adiponectin mRNA levels in rat epididymal adipose tissue. *Clin Sci.* 105: 403-408 (2003).

NASCIMENTO, A.F.; SUGIZAKI, M.M.; LEOPOLDO, A.S.; LIMA-LEOPOLDO, A.P.; NOGUEIRA, C.R.; NOVELLI, E.L.; PADOVANI, C.R.; CICOGNA, A.C. - Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.*41(3):253-9 (2008).

NEGRÃO, A.B.; LICINIO, J. - Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 44(3): 205-14 (2000).

Referências

NIRAJ, A.; PRADHAN, J.; FAKHRY, H.; VEERANNA, V.; AFONSO, L. - Severity of coronary artery disease in obese patients undergoing coronary angiography: "obesity paradox" revisited. *Clin Cardiol.* 30(8):391-6 (2007).

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. "WHO - World Health Organization. Obesity and Overweight." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. (acesso 06/04/2011 às 08:30 am).

PROCOPIO, C.; ANDREOZZI, F.; LARATTA, E.; CASSESE, A.; BEGUINOT, F.; ARTURI, F.; HRIBAL, M.L.; PERTICONE, F.; SESTI, G. - Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/Akt signaling pathway is attenuated by interaction with C-reactive protein. *Endocrinology.* 150(8):3584-93 (2009).

RAHMOUNI, K.; MORGAN, D.A.; MORGAN, G.M.; MARK, A.L.; HAYNES, W. G. - Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes.* 54 (7): 2012-8 (2005).

RASOULI, N.; MOLAVI, B; ELBEIN, S.C.; KERN, P.A. - Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. *Diabetes, Obes. Metab.* 9(1): 1–10 (2007).

ROBERTS, C.K.; BARNARD, R.J.; SINDHU, R.K.; JURCZAK, M.; EHDAIE, A.; VAZIRI, N.D. - A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol.* 98(1):203-10 (2005).

RODRÍGUEZ, A.; FORTUÑO, A.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; ZALBA, G.; DÍEZ, J.; FRÜHBECK, G. - The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinology*, 148(1): 324-31 (2007).

ROSMOND, R. - Aetiology of obesity: a striving after wind? *Obes. Rev.* 5: 177–181 (2004).

SAHIN, A. S.; BARISKANER, H. - The mechanisms of vasorelaxant effect of leptin on isolated rabbit aorta. *Fundam Clin Pharmacol.* 21(6): 595-600 (2007).

SAHU, A. - Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front. Neuroendocrinol.* 24(4): 225–253 (2004).

Referências

- SHARMA, V.; DHILLON, P.; WAMBOLT, R.; PARSONS, H.; BROWNSEY, R.; ALLARD, M.F.; MCNEILL, J.H. - Metoprolol improves cardiac function and modulates cardiac metabolism in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(4):H1609-20 (2008).
- SICHERI R, NASCIMENTO S, COUTINHO W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 23(7):1721-1727 (2007).
- SINGHAL, A.; FAROOQI, I. S.; COLE, T. J., O'RAHILLY, S.; FEWTRELL, M.; KATTENHORN, M.; LUCAS, A.; DEANFIELD, J.- Influence of Leptin on Arterial Distensibility: A Novel Link Between Obesity and Cardiovascular Disease? *Circulation*. 106:1919-1924 (2002).
- SONG, S.; ANDRIKOPOULOS, S.; FILIPPIS, C.; THORBURN, A.W.; KHAN, D.; PROIETTO, J. - Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281(2):E275–E282 (2001).
- SORBEY, C.G. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21(1): 28-38 (2001).
- SPEAKMAN, J.; HAMBLY, C.; MITCHELL, S.; KRÓL, E. - Animal models of obesity. *Obes.Rev*. 8 (Suppl. 1): 55–61(2007).
- SPECTER, S.E.; HAMILTON, J.S.; STERN, J.S.; HORWITZ, B.A. - Chronic protein restriction does not alter energetic efficiency or brown adipose tissue thermogenic capacity in genetically obese (fa/fa) Zucker rats. *J Nutr*.125(8):2183-93 (1995).
- TADDEI, S.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; SUDANO, I.; SALVETTI, A. - Endothelial dysfunction in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 38 Suppl 2:S11-4 (2001).
- TRIGGLE, C.R.; HOLLENBERG, M.; ANDERSON, T.J.; DING, H.; JIANG, Y.; CERONI, L.; WIEHLER, W.B.; NG, E.S.; ELLIS, A.; ANDREWS, K.; MCGUIRE, J.J.; PANNIRSELVAM, M. The endothelium in health and disease - a target for therapeutic intervention. *J. Smooth Muscle Res*.39(6): 249-267 (2003).
- TSAI, A.G.; WILLIAMSON, D.F.; GLICK, H.A. Direct medical cost of overweight and obesity in the USA: a quantitative systematic review. *Obes. Rev*.12:50–61 (2011).
- VECCHIONE, C.; MAFFEI, A.; COLELLA, S.; ARETINI, A.; POULET, R.; FRATI, G.; GENTILE, M.T.; FRATTA, L.; TRIMARCO, V.; TRIMARCO, B.; LEMBO, G. - Leptin

Referências

effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*. 51(1):168-73 (2002).

VECCHIONE, C.; ARETINI, A.; MAFFEI, A.; MARINO, G.; SELVETELLA, G.; POULET, R.; TRIMARCO, V.; FRATI, G.; LEMBO, G. - Cooperation between insulin and leptin in the modulation of vascular tone. *Hypertension*. 42(2):166-70 (2003).

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P.R.B. – Expressão das óxido nítrico sintetases na fisiopatologia das doenças cardiovasculares. *Arq. Bras. Cardiol*. 74(4):365-379 (2000).

VYKOUKAL, D; DAVIES, M.G. - Vascular biology of metabolic syndrome. *J Vasc Surg*. Mar 23 (2011) in press.

WATT, M.J.; STEINBERG, G.R. - Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochemical Journal* 414: 313-325 (2008).

ZRAIKA, S.; DUNLOP, M.; PROIETTO, J.; ANDRIKOPOULOS, S. - Effects of free fatty acids on insulin secretion in obesity. *Obes. Rev*. 3:103–112 (2002).