



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

ANDRESSA SILVA SOUSA

**PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM AORTA DE
CAMUNDONGOS TREINADOS E TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

CAMPINAS

2016



ANDRESSA SILVA SOUSA

**PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM AORTA DE
CAMUNDONGOS TREINADOS E TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestra
em Biologia Funcional e Molecular, na área
de Fisiologia.

Orientadora: MARIA ANDRÉIA DELBIN

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida pela aluna ANDRESSA
SILVA SOUSA e orientada pela PROFA. DRA.
MARIA ANDRÉIA DELBIN

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 131676/2014-8

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

So85p Sousa, Andressa Silva, 1990-
Papel do tecido adiposo perivascular em aorta de camundongos treinados e tratados com dieta hiperlipídica / Andressa Silva Sousa. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Tecido adiposo. 2. Adipocinas. 3. Reatividade vascular. 4. Treinamento aeróbio. I. Delbin, Maria Andréia, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of perivascular adipose tissue in the aorta of mice trained and treated with high-fat-diet

Palavras-chave em inglês:

Adipose tissue

Adipokines

Vascular reactivity

Endurance training

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Andréia Delbin [Orientador]

Fernanda Bruschi Marinho Privieiro

Bruno Rodrigues

Data de defesa: 23-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 23 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Andréia Delbin (Orientadora)

Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Privieiro

Prof. Dr. Bruno Rodrigues

Dra. Emerielle Cristine Vanzela (suplente)

Profa. Dra Dora Maria Grassi-Kassisse (suplente)

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

Dedico esse trabalho à minha família,
especialmente minha mãe e minha irmã
Andrielle.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus por guiar meus passos e ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que deram todo suporte nesta etapa da minha vida e ofereceram muitos recursos para meu crescimento profissional.

A minha orientadora Maria Andréia, pelo suporte, correções e incentivos. Sou muito grata pelos seus ensinamentos e sua motivação.

Agradeço a minha mãe Efigênia que, com seu jeito, sempre me incentivou e nunca duvidou do meu potencial, me mostrou que vale a pena lutar com amor por tudo. A minha irmã Andrielle que sempre esteve ao meu lado e me fez acreditar em mim mesma.

Ao meu pai Walmir que me fortaleceu e foi muito importante para conclusão dessa etapa. E aos outros familiares que de alguma forma deixaram sua marca nesse processo de aprendizagem.

Ao meu namorado, Cristiano, por sua paciência e cuidado comigo, sempre me trazendo ânimo e a certeza de que tudo ia bem. Sua companhia fez toda diferença.

Meus agradecimentos aos amigos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza. Principalmente os colegas de laboratório César, Nathália, Jamaira, Daniele, Stefano, Hygor, Natali, Nádia e Carmem companheiros de trabalho que foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

Agradeço em especial a minha colega Amanda Sponton que me ajudou em cada momento, dando passos ao meu lado e me incentivando a dar o melhor de mim. Sou muito grata por sua parceria.

As agências de fomento CNPq e FAEPEX pelo auxílio financeiro, as quais possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e participação em eventos científicos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do tecido adiposo perivascular (PVAT) na reatividade vascular em aorta de camundongos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica. Camundongos C57BL6/JUnib (6-7 semanas/20-24 gramas) foram divididos em 4 grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Por dezesseis semanas os grupos c-SD e c-TR foram alimentados com ração balanceada e os grupos dh-SD e dh-TR com dieta hiperlipídica. Após a oitava semana, apenas os grupos c-TR e dh-TR iniciaram o treinamento físico aeróbio moderado em esteira, 5 dias/semana, 60 min por sessão (10 min a 40% da velocidade máxima, 40 min a 60-70% da velocidade máxima e 10 min a 40% da velocidade máxima) e 0% de inclinação, até o final do protocolo. A reatividade vascular em anéis de aorta torácica, na presença e na ausência do PVAT (PVAT+/PVAT-) foi verificada através de curvas concentração-resposta à: acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP), análogo do tromboxano A₂ (U46619) e endotelina-1 (ET-1). A expressão das proteínas: eNOS e iNOS foram determinadas na aorta e no respectivo PVAT, bem como a produção de óxido nítrico (NO). Fatores bioquímicos circulantes e o índice HOMA-RI foram determinados. O grupo dh-SD apresentou aumento do peso corporal, gordura epididimal, glicose, colesterol total, triglicerídeos, insulina, leptina, resistina, TNF- α , TBARS e índice HOMA-RI quando comparado ao grupo c-SD. O treinamento físico aeróbio foi eficaz em reduzir os valores de insulina, TNF- α e TBARS e aumentar o índice HOMA-RI no grupo dh-TR. O peso do PVAT foi aumentado nos grupos dh-SD e dh-TR comparados aos grupos c-SD e c-TR. A potência (pEC₅₀) e a resposta máxima (E_{MAX}) a ACh não foram alteradas em anéis PVAT+ nos grupos c-SD e c-TR. Porém, a presença do PVAT reduziu em aproximadamente 2,3 vezes a pEC₅₀ e em 14% a E_{MAX} no grupo dh-SD, associada com redução na produção de NO na aorta e aumento da expressão de iNOS no PVAT. O treinamento físico no grupo dh-TR, normalizou a função vascular em anéis PVAT+, com aumento da expressão de eNOS e produção de NO na aorta, bem como redução da expressão de iNOS no PVAT. Não observadas diferenças nos anéis PVAT-/PVAT+ para os agentes SNP, U46619 e ET-1. Concluímos que a presença do PVAT causou disfunção endotelial em aorta torácica de camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica associada com redução na produção de NO na aorta e aumento na expressão de iNOS no PVAT, o treinamento aeróbio normalizou as alterações vasculares e no PVAT.

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

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the role of perivascular adipose tissue (PVAT) on vascular reactivity of aorta in trained mice fed with high-fat diet. Male mice C57BL6/JUnib (6-7 weeks/20-24 grams) were divided into 4 groups: sedentary control (c-SD), trained control (c-TR), sedentary high-fat diet (dh-SD) and trained high-fat diet (dh-TR). For sixteen weeks the c-SD and c-TR groups were fed with standard chow and the dh-SD and dh-TR groups were fed with high-fat diet. After eight weeks, only the c-TR and dh-TR groups initiated aerobic physical training on a treadmill, 5 days/week, 60 minutes per session (10 min at 40% of maximum speed, 40 min at 60-70% of maximum speed and 10 min 40% of maximum speed) and 0% grade until the end of the full protocol. Concentration-response curves to acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), thromboxane A₂ (U46619) and endothelin (ET1), were obtained in thoracic aorta in the presence or absence (PVAT+/PVAT-) of PVAT. The protein expressions of eNOS and iNOS were determined in the aorta and in the respective PVAT, as well as, the nitric oxide production. Biochemical parameters and HOMA-RI index were determined. The animals from dh-SD group had a significantly increased in body weight, epididymal fat pad, glucose, total cholesterol, triglycerides, insulin, leptin, resistin, TNF- α and TBARS; and decreased in HOMA-RI index as compared with c-SD group. Exercise training was effective to reduce insulin, TNF- α and TBARS, as well as, to increase HOMA-RI index. The amount of PVAT was markedly increased in dh-SD and dh-TR groups. The PVAT+ did not modify the relaxation response to ACh in c-SD and c-TR groups. However the presence of PVAT reduced by approximately 2.3 times the potency (pEC₅₀) and 14% the maximal responses (E_{MAX}) in dh-SD when compared to PVAT-, associated with reduced NO production in aorta and increased iNOS protein expression in PVAT. Exercise training normalized the vascular response in rings PVAT+, increased eNOS protein expression and NO production in aorta and decreased the iNOS in PVAT. The PVAT+ did not change the responses to SNP, U46619 and ET-1 in all groups. In conclusion, the presence of PVAT causes endothelial dysfunction in thoracic aorta from sedentary mice fed with high-fat diet associated with decreased NO production and increased protein expression of iNOS in PVAT. Aerobic exercise training normalized the vascular and PVAT alterations.

Keyword: perivascular adipose tissue, adipokines, vascular reactivity, aerobic exercise and high-fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia e nomenclatura de algumas regiões com o depósito de PVAT.....	20
Figura 2. Possíveis mecanismos através dos quais o PVAT, as células do músculo liso vascular e as células endoteliais se interagem.....	23
Figura 3. Vias de sinalização mediadas pelo shear stress nas células endoteliais.....	28
Figura 4. Grupos experimentais.....	32
Figura 5. Teste de esforço máximo inicial e teste de esforço máximo final.....	40
Figura 6. Peso inicial, peso final, peso do tecido adiposo epididimal e ingesta calórica.....	41
Figura 7. Glicemia, insulina e índice HOMA-RI.....	42
Figura 8. Colesterol total e Triglicerídeos.....	43
Figura 9. Leptina, Resistina e TNF-alfa.....	44
Figura 10. Adiponectina total e adiponectina de alto peso molecular.....	44
Figura 11: Níveis séricos de malondialdeído (μM)	45
Figura 12: Peso do PVAT.....	45
Figura 13: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular.....	47
Figura 14: Curvas concentração-resposta ao Nitroprussiato de Sódio (SNP) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular.....	48
Figura 15: Curvas concentração-resposta ao Análogo do Tromboxano A2 (U46619) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular.....	50
Figura 16: Curvas concentração-resposta a Endotelina (ET1) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular	51

Figura 17: Expressão proteica de eNOS e iNOS em aorta torácica; eNOS e iNOS no PVAT.....	53
---	----

Figura 18: Análise da biodisponibilidade de NO através de fluorescência com corante sensível ao NO: 4,5-diaminofluorece (DAF-2) de secções de aorta torácica.....	54
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de delta da contração máxima induzida pelo cloreto de potássio 80 mM (Δ KCl, mN/mm) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular 46
- Tabela 2.** Valores de potência (pEC_{50}) obtidos a partir de curvas concentração resposta à acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular..... 49
- Tabela 3.** Valores de potência (pEC_{50}) obtidos a partir de curvas concentração resposta ao Análogo do Tromboxano A2 (U46619) e à Endotelina (ET1) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular..... 52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 O ENDOTÉLIO VASCULAR E AS CÉLULAS MUSCULARES LISAS...	17
2.2 O TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR.....	20
2.3 DISFUNÇÃO VASCULAR E OBESIDADE.....	24
2.4 EXERCÍCIO FÍSICO.....	26
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	29
4 OBJETIVOS.....	30
4.1. OBJETIVO GERAL.....	30
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 ANIMAIS	31
5.2 PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR.....	32
5.3 PROGRAMA DE TREINAMENTO FÍSICO.....	32
5.4 MEDIDA DE GLICEMIA.....	34
5.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA, AORTA E PVA.....	34
5.6 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA EM ANÉIS DE ARTÉRIA AORTA	34
5.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN-BLOTTING.....	35
5.8 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM AORTA TORÁCICA.....	36
5.9 DETERMINAÇÃO DE FATORES BIOQUÍMICOS SÉRICOS E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	37
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
6 RESULTADOS.....	39
6.1 TESTE DE EXAUSTÃO E EFICÁCIA DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO.....	39
6.2 PESO CORPORAL E TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL.....	40
6.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RESISTÊNCIA À INSULINA.....	41
6.4 REATIVIDADE VASCULAR EM AORTA.....	45
6.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS.....	52
6.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	53
7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS.....	55
8 DISCUSSÃO.....	57
8.1 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	57
8.2 ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO VASCULAR DA AORTA TORÁCICA	62

9 CONCLUSÃO.....	66
10 REFERÊNCIAS.....	67
11 ANEXO.....	82
11.1 ANEXO A- Parecer da Comissão de Ética no uso de animais.....	82
11.1 ANEXO B- Declaração referente a direitos autorais.....	83

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015) anunciou em 2014 que mais de 1,9 bilhões de adultos acima de 18 anos estavam com sobrepeso, sendo que desses indivíduos 600 milhões já eram obesos. No Brasil o número de pessoas com sobrepeso/obesidade aumenta de forma crescente tornando-se um problema de saúde pública. Dados do Ministério da Saúde de 2013 indicavam que 50,8% dos brasileiros estão acima do peso ideal e que, destes, 17,5% são obesos. Sabe-se que esses indivíduos apresentam maior risco para o desenvolvimento de patologias como diabetes tipo 2, desordens musculoesqueléticas, câncer e doenças cardiovasculares. Dentre essas enfermidades relacionadas a obesidade, as doenças cardiovasculares apresentam grande importância, visto que encontram-se no topo das causas de morte no mundo em 2012 (OMS, 2015).

Acredita-se que a causa fundamental do sobrepeso e da obesidade está no desequilíbrio entre calorias consumidas e gastas. Globalmente, há um aumento da ingestão de alimentos muito energéticos (ricos em gordura) e um aumento da inatividade física devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho. (OMS, 2015). Evidências mostram que o sedentarismo é o quarto maior fator de risco para mortes globais por doenças secundárias, sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento da obesidade (OMS, 2010).

Trabalhos que envolvem a indução da obesidade em modelos animais mostram-se úteis às pesquisas devido a sua grande semelhança com a gênese e as respostas metabólicas decorrentes do sobrepeso/obesidade em humanos (WEST e YORK, 1998; TSCHOP e HEIMAN, 2001). Especificamente o modelo de indução de obesidade por dieta hiperlipídica em camundongos C57BL6/J está bem estabelecido, e os resultados mostram aumento nos valores de peso corporal, gordura epididimal, insulina sanguínea e triglicerídeos (TSUKUMO et al., 2007; CALIXTO et al., 2010; XU et al., 2011). Sendo assim, este modelo tem se mostrado uma ferramenta útil no estudo dos efeitos do sobrepeso/obesidade.

A associação entre sedentarismo e obesidade na gênese das doenças cardiovasculares está bem descrita, porém os mecanismos celulares e moleculares ainda não são totalmente entendidos. Sendo a obesidade considerada uma doença cardiometabólica ela apresenta um complexo desequilíbrio nos sistemas fisiológicos e consequente comprometimento no funcionamento ideal do sistema cardiovascular

em especial nos vasos sanguíneos.

A integridade das células endoteliais desempenha fundamental papel na manutenção e no controle do tônus vascular, na pressão arterial, função plaquetária, resposta inflamatória bem como na regulação endócrino-metabólico da musculatura esquelética (ZANESCO; ANTUNES, 2007). Por outro lado, a disfunção endotelial caracterizada por menor produção e/ou menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais acarreta alterações no sistema cardiovascular e endócrino-metabólico. De fato, diversos estudos realizados em ratos, camundongos e cobaias tratados com dieta hiperlipídica demonstraram diminuição da resposta relaxante dependente de endotélio em aorta (LI et al., 2007; DENG et al., 2010; KETONEN et al., 2010; DIWAN et al., 2011; XU et al., 2011) e artéria mesentérica (MORAES et al., 2008; VAN DRONGELEN et al., 2012).

Mais recentemente, estudos demonstram que, adicional à relevância do endotélio, o tecido adiposo perivascular (PVAT) desempenha importante papel no controle do sistema cardiovascular e endócrino-metabólico (GAO et al., 2007; AGHAMOHAMMADZADEH et al., 2012). Evidências mostram que o PVAT pode modular a resposta inflamatória vascular, a reatividade vascular e a proliferação de células da musculatura lisa vascular (RAJSHEKER et al., 2010).

Além disso, o exercício físico aeróbio de moderada intensidade, realizado continuamente, promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas. (CIOLAC; GUIMARÃES, 2004; ZANESCO; ANTUNES, 2007). Os mecanismos pelos quais o exercício físico de moderada intensidade provoca benefícios cardiovasculares e endócrino-metabólicos envolve complexos caminhos de sinalização celular e molecular e despertam interesse em diversas linhas de pesquisa.

O exercício físico aeróbio é considerado um potente estimulador da produção de NO através da ativação de mecanossensores presentes nas células endoteliais, os quais são acoplados a diferentes mecanismos de sinalização intracelular. Assim, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular na melhora da função vascular está diretamente relacionado à sua capacidade de estimular a síntese de NO pelas células endoteliais.

Até o momento apenas dois estudos avaliaram o papel do PVAT associado aos efeitos do treinamento físico e da dieta hiperlipídica, sendo desenvolvidos em artéria coronária circunflexa esquerda de porcos

(REIFENBERGER et al., 2007; BUNKER; LAUGHLIN, 2010). Com isso, novos estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de investigar esta importante via de sinalização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ENDOTÉLIO VASCULAR E AS CÉLULAS MUSCULARES LISAS

Os vasos sanguíneos são compostos basicamente por três camadas: a camada íntima, média e adventícia. A camada íntima é constituída pelas células endoteliais e está em íntimo contato com os elementos do sangue. A camada média é composta por células musculares lisas e a camada adventícia reveste a parte externa do vaso, sendo composta de tecido fibroso (STANFIELD, 2013).

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

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

Dentre essas substâncias, como já citado, o NO tem suas funções destacadas pela sua importante ação vasodilatadora, sendo capaz de difundir-se facilmente através das membranas biológicas. Sua produção fisiológica é realizada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que são expressas em vários tecidos do organismo. São monooxidases com grupamento heme que catalisam a oxidação de

L-arginina, na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido (NADPH) tendo como produto L-citrulina e NO. A interação agonista-receptor na célula endotelial ativa a formação de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) que induz a liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) do retículo sarcoplasmático, elevando a concentração de Ca^{2+} intracelular, formando o complexo cálcio (Ca^{2+}) / calmodulina (CaM), ativando a NOS que forma NO a partir da L-arginina (FORSTERMANN; SESSA, 2011).

Em mamíferos, são identificadas três isoformas da NOS, produtos de genes distintos, mas com alto grau de homologia: a constitutiva NOS neuronal (nNOS ou NOS I), a NOS induzida (iNOS ou NOS II) e a constitutiva NOS endotelial (eNOS ou NOS III). 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 hemodímero (FORSTERMANN; SESSA, 2011).

Embora haja associação entre as isoformas da NOS, há da mesma forma uma importante diferença entre as isoenzimas. Enquanto a nNOS e eNOS ligam-se ao complexo CaM e sua ativação responde a mudanças fisiológicas na concentração intracelular de íons Ca^{+2} , a iNOS possui a CaM ligada sendo possível ativá-la em baixas concentrações de Ca^{+2} (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

A eNOS é amplamente expressa no endotélio vascular, muito sensível a estímulos químicos de agonistas como bradicinina, acetilcolina, histamina, trifosfato de adenosina, entre outros. Do mesmo modo, ela pode ser ativada por estímulo mecânico resultante do aumento do fluxo sanguíneo, como a força de cisalhamento ou *shear stress*, que é um dos mais importantes estímulos para as células endoteliais produzirem NO dependente de tirosina quinase e independente do aumento nas concentrações de Ca^{+2} (ALDERTON, COOPER; KNOWLES, 2001).

O NO se difunde, depois de sintetizado, para a musculatura lisa vascular, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) que converte trifosfato de guanossina (GTP) em monofosfato cíclico de guanossina (GMPc). O GMPc estimula a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que pode induzir a hiperpolarização ativando canais de potássio (K^+), contribuindo para o efluxo de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático para o citoplasma, onde inibe a geração de IP_3 , reduzindo as

concentrações de Ca^{2+} levando a vasodilatação. A PKG também pode reduzir a sensibilidade à CaM, reduzindo a contração muscular (IGNARRO et al., 1987).

Como podemos perceber, juntamente ao endotélio há a participação das células musculares lisas na manutenção do tônus vascular que modulam diversas funções como vasoconstrição, vasodilatação, síntese de colágeno, proteoglicanos e elastina, migração e proliferação celular, entre outros, e são predominantemente encontrados na camada média dos vasos (COLAÇO et al., 2008).

Os principais mecanismos que regulam o estado contrátil das células do músculo liso vascular são as mudanças na concentração de Ca^{2+} no citosol e no grau de fosforilação das proteínas contráteis. Assim, um aumento ou diminuição dos íons Ca^{2+} no citosol resulta em contração ou relaxamento dessas células. É interessante ressaltar que o músculo liso vascular encontra-se parcialmente contraído, em condições fisiológicas, sendo influenciado por diversas condições como sinais neuronais, endoteliais, humorais e miogênicos (AKATA, 2007).

Existem dois tipos de acoplamento do músculo liso, que marcam o início da contração nesse tecido: acoplamento eletromecânico e farmacomecânico. O primeiro ocorre em consequência do influxo de Ca^{2+} através de canais tipo L, dependentes de voltagem, que resultam na despolarização da membrana celular aumentando a concentração de Ca^{2+} intracelular e dando início ao processo contrátil. O acoplamento farmacomecânico é ativado pela interação entre um ligante e seu receptor, presente na membrana do músculo liso, que estimula a entrada de Ca^{2+} para o citosol e inicia toda a maquinaria contrátil (OGUT, 2003). O Ca^{2+} presente no citosol liga-se a proteína calmodulina formando o complexo CaM que, por sua vez, ativa a enzima miosina quinase, responsável por fosforilar o sítio ativo da cadeia leve de miosina, fazendo com que esta proteína ligue-se aos filamentos de actina promovendo a contração muscular (GUYTON; HALL, 2006). Agonistas contráteis ligam-se aos seus receptores específicos acoplados a proteína G e a cascata de sinalização é iniciada pela ativação da fosfolipase C que catalisa a formação de segundos mensageiros, a partir de fosfolípidos de membrana, gerando IP_3 e diacilglicerol (DAG). O IP_3 liga-se aos seus receptores no retículo sarcoplasmático promovendo a liberação de Ca^{2+} para o citosol. O DAG ativa proteína quinase C (PKC), que por sua vez, fosforila proteínas de membrana ligadas a canais para Ca^{2+} do tipo L, favorecendo o influxo de Ca^{2+} para o citosol. O processo de contração é mantido até que a enzima miosina fosfatase catalise a defosforilação da cadeia leve

de miosina, inativando o complexo actina-miosina, promovendo relaxamento ou tônus basal (WEBB, 2003). Após evento excitatório, o relaxamento e a homeostase do Ca^{2+} se dá por sua recaptação pelos compartimentos de estoques intracelulares e pelo efluxo para o meio extracelular (VASCONCELOS; CARVALHO, 2005).

De fato, os mecanismos que envolvem a regulação do tônus vascular são complexos e todas essas ações desenvolvidas pelo endotélio e músculo liso demonstram o quanto essas vias são essenciais para manutenção da homeostasia vascular. Atualmente, adicional a relevância do endotélio foi demonstrada o importante papel do tecido adiposo perivascular (PVAT) no controle do tônus vascular.

2.2 O TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR (PVAT)

O PVAT sempre foi compreendido apenas como um suporte mecânico para a vasculatura e por isso foi rotineiramente removido dos vasos sanguíneos para estudo da função vascular (GAO, 2007). O PVAT possui características especiais, está localizado ao redor da maioria dos vasos sanguíneos sistêmicos (com exceção da circulação cerebral), encontra-se ao exterior da camada adventícia vascular e, interessantemente, não possui nenhuma estrutura laminar ou barreira que os separe (PVAT e camada adventícia vascular), podendo assim influenciar diretamente a função vascular (Figura 1) (GAO et al., 2007).

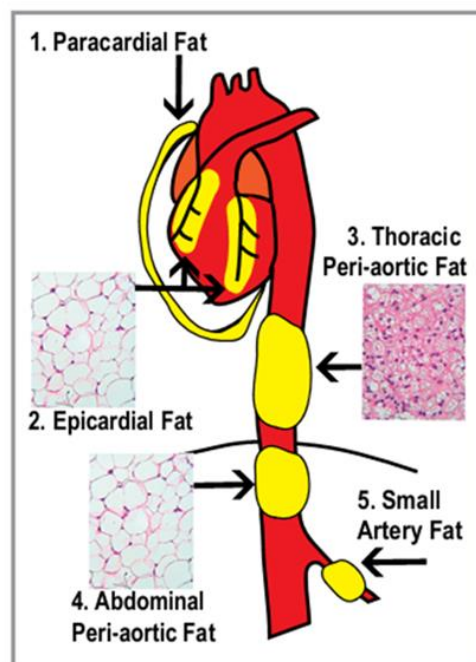


Fig. 1: Anatomia e nomenclatura de algumas regiões com o depósito de PVAT (Fitzgibbons, et al. 2014).

O PVAT é responsável pela liberação de grande variedade de substâncias tais como adipocinas (pró-inflamatórias: leptina, resistina e visfatina; anti-inflamatórias: adiponectina e adrenomedulina), citocinas e quimiocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , proteína quimiotática de monócitos-MCP1, inibidor do ativador de plasminogênio-PAI1) (RAJSHEKER et al., 2010), substâncias do sistema renina-angiotensina (angiotensina II e angiotensina 1-7) (GALVEZ-PRIETO et al., 2008) e moléculas gasosas (NO, peróxido de hidrogênio- H_2O_2 , ânion superóxido- O_2^- e sulfeto de hidrogênio- H_2S) (GAO et al., 2007; FANG et al., 2009).

Adicionalmente, o PVAT pode expressar importantes complexos tais como: receptores de adipocinas, proteína desacopladora 1 (UCP-1), coativador do receptor gama ativado por peroxissoma proliferador (PPAR- γ), receptor β_3 adrenérgico, receptor de citocinas, receptor de angiotensina II, enzima NADPH oxidase, eNOS (DASHWOOD et al., 2007) e todas as isoformas da superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Ec-SOD), lipoxigenases e metaloproteases (SZASZ; WEBB, 2012).

Em 1991, Soltis e Cassis desmonstraram que a presença do PVAT em aorta de ratos atenuava o efeito contrátil da noradrenalina, evidenciando um efeito anticontrátil do PVAT. Entretanto, apenas em 2002, Lohn e colaboradores reavaliaram o papel do PVAT e constataram que este tecido era capaz de produzir e liberar fatores que influenciavam no tônus vascular. Posteriormente, outros estudos passaram a investigar os possíveis mecanismos envolvidos na resposta anticontrátil do PVAT (DUBROVSKA et al., 2004; GOLLASCH et al., 2004; WESTON et al., 2013; WITHERS et al., 2014). Este efeito anticontrátil é complexo e envolve diversas vias de sinalização. Estudos evidenciaram que o PVAT produz um fator relaxante derivado do adipócito (ADRF) que pode promover a abertura de canais de K^+ dependentes de ATP, canais de K^+ dependentes de voltagem, e ainda canais de K^+ ativados por cálcio de baixa condutância, causando hiperpolarização das células do músculo liso vascular e relaxamento (LOHN et al., 2002; VERLOHREN et al., 2004; GAO et al., 2007).

Outros trabalhos demonstraram o envolvimento da liberação de H_2O_2 pelas células do PVAT, promovendo a formação de GMPc e relaxamento vascular (GAO et al., 2007; WANG, 2008). Foi demonstrado que a leptina possui efeito direto

no relaxamento vascular, mesmo na ausência do PVAT, em artéria mesentérica de cães (MOHAMMED et al., 2007), aorta de coelhos (SAHIN; BARISKANER, 2007) e em humanos (NAKAGAWA et al., 2002), cuja resposta é mediada por mecanismos dependentes de NO (RAHMOUNI; HAYNES, 2005; SAHIN et al., 2007). Outro estudo mais recente sugere que a leptina é capaz de estimular a produção NO no PVAT da artéria mesentérica de camundongos (GIL-ORTEGA et al., 2010).

Acredita-se também que a ativação de receptores β_3 adrenérgicos no PVAT possa promover a liberação de adiponectina, que atua em seu receptor nas células do músculo liso vascular promovendo hiperpolarização e relaxamento (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005; AGHAMOHAMMADZADEH et al., 2012). Por fim, a fenilefrina e serotonina, atuando em receptores específicos do PVAT podem estimular a produção de NO via NOS e consequentemente relaxamento da célula muscular lisa (MALINOWSKI et al., 2008; AGHAMOHAMMADZADEH et al., 2012). Todos estes mecanismos estão resumidos na figura 2.

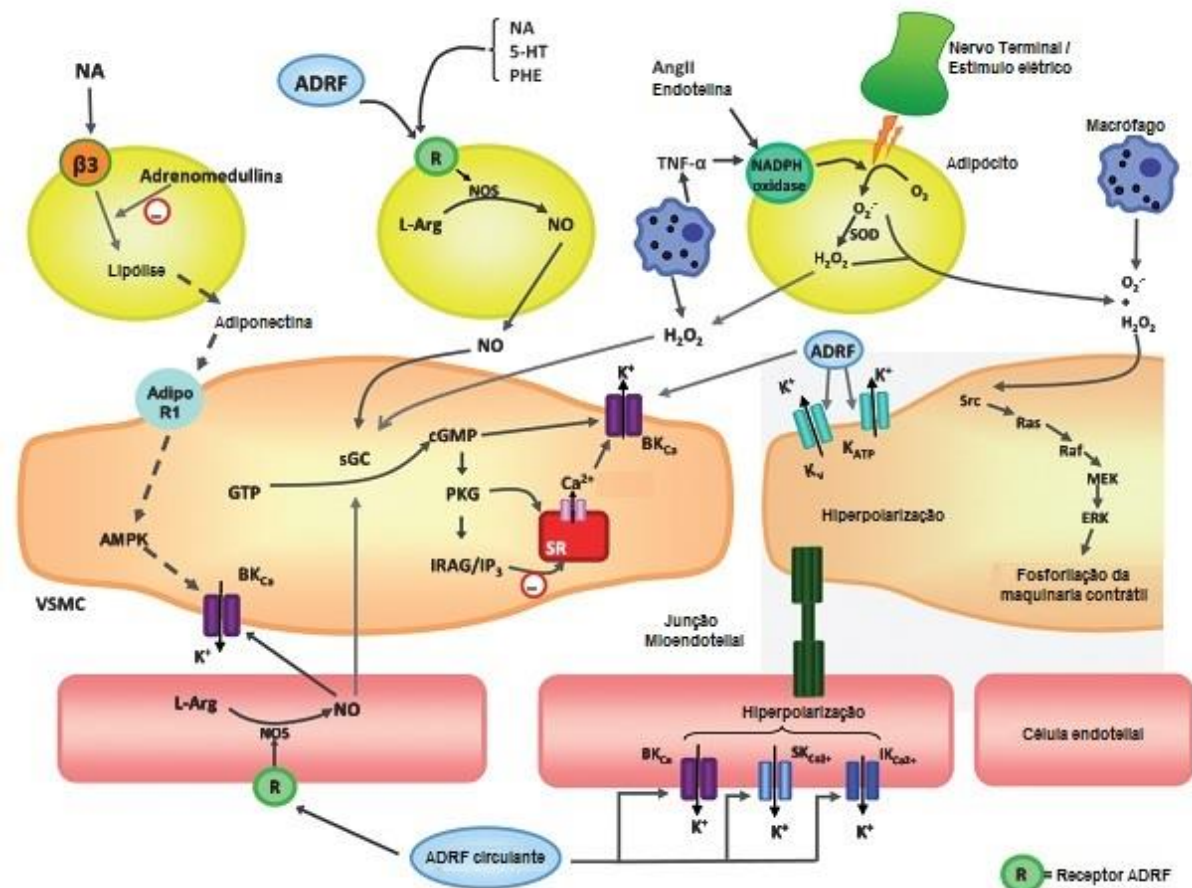


Fig. 2: Possíveis mecanismos através dos quais o PVAT, as células do músculo liso vascular e as células endoteliais interagem (adaptado de Aghamohammadzadeh, et al. 2012). As linhas pontilhadas representam vias ainda não confirmadas. ADRF, fator relaxante derivado do adipócito; AMPK, proteína Kinase ativada por AMP; Ang II, angiotensina II; BK_{Ca} , canal de potássio ativado por cálcio de larga condutância; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); GTP, trifosfato de guanossina; cGMP, monofosfato de guanossina ciclica; IP3, inositol trifosfato; IRAG, receptor IP3 associado ao cGMP; IK_{Ca} , canal de potássio ativado por cálcio de condutância intermediária; K_v , canal de potássio voltagem dependente; K_{ATP} , canal de potássio ATP sensível; L-Arg, L-arginina; NA, noradrenalina; NO, óxido nítrico; NOS, sintase de óxido nítrico; $O_2^{\cdot -}$, ânions superóxido; $ONOO^-$, peróxinitrito; PCS, via da prostaciclina; PHE, fenilefrina; PGH2, prostaglandina H2; PGI2, prostaglandina I2; PKG, Proteína quinase G; R, receptor; sGC, guanilato ciclase solúvel; SK_{Ca} , canal de potássio ativado por cálcio de baixa condutância; SOD, superóxido dismutase; SR, retículo sarcoplasmático; TNF, fator de necrose tumoral; VSMC, célula do músculo liso vascular.

Em termos de classificação, o PVAT encontrado na aorta é considerado tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), porém se assemelha muito mais com o TAM, por possuir células adiposas multiloculares, abundância em mitocôndrias e significativa expressão de UCP-1 (FITZGIBBONS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015).

Recentemente, foi demonstrada a influência do PVAT na redução da formação de placas aterogênicas por indução da autofagia em macrófagos através

da secreção de adiponectina (LI et al. 2015) e por possuir características de tecido adiposo marrom, podendo modular a termorregulação intravascular impedindo a perda de temperatura na vasculatura (CHANG et al. 2012). Desse modo, em indivíduos saudáveis a presença do PVAT possui efeito anticontrátil, anti-inflamatório e antiaterogênico contribuindo para manutenção da função vascular.

2.3 DISFUNÇÃO VASCULAR E OBESIDADE

A Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia -SBEM (2014) caracteriza a obesidade através do acúmulo excessivo de gordura corporal no indivíduo, e para o seu diagnóstico o parâmetro mais comum é o índice de massa corporal (IMC). O IMC é um padrão utilizado pela OMS obtido dividindo o peso (Kg) pela altura (m) ao quadrado do indivíduo e identifica o peso normal quando o resultado do cálculo do IMC está entre 18,5-24,9 kg/m², sobrepeso entre 25-29,9 kg/m², obesidade entre 30-39,9 kg/m² e obesidade grave > que 40 kg/m². Além do IMC, existem outras medidas antropométricas adicionais que estabelecem o diagnóstico de obesidade, como a razão cintura/quadril e pregas cutâneas.

No Brasil existem cerca de 18 milhões de pessoas obesas e juntamente com os indivíduos com sobrepeso este número alcança 70 milhões (SBEM, 2014). Eckel et al. (2004) afirmam que esses dados não se limitam somente a população brasileira e a prevalência mundial da obesidade é crescente em praticamente todas as populações e faixas etárias. Os autores ainda estabelecem que essas taxas elevadas refletem um excesso de peso em resposta principalmente as mudanças ambientais e culturais da população.

Alguns trabalhos acerca da obesidade e seus distúrbios associados abordam principalmente a função e/ou disfunção do tecido adiposo, o que parece ser um fator determinante no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas associadas à obesidade (BLUHER, 2009; HAJER et al., 2008). Embora existam estudos que relacionem a disfunção vascular com a obesidade, os mecanismos envolvidos são complexos e não estão totalmente esclarecidos, podendo variar a resposta quanto ao leito vascular e ao modelo animal utilizado (STAPLETON et al., 2008; HAJER et al., 2008).

As adipocinas produzidas pelo tecido adiposo branco estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos, entre eles o controle da ingestão alimentar,

a homeostase energética, sensibilidade à insulina, a angiogênese, proteção vascular, regulação da pressão arterial, coagulação sanguínea e resposta inflamatória (HAUNER, 2004; RAJSHEKER et al., 2010). Os efeitos deletérios da obesidade têm sido associados com o desenvolvimento de um estado crônico de inflamação, com aumento na produção de liberação de fatores pró-inflamatórios.

Em especial, sabe-se que na obesidade a disfunção endotelial desempenha papel principal no desenvolvimento das complicações vasculares (MONTEIRO et al., 2012). O termo disfunção endotelial se refere a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, coagulação, agregação plaquetária e fibrinólise (COLAÇO et al., 2008). A disfunção endotelial também é referida como prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, causado pela redução da síntese e/ou biodisponibilidade de NO, aumento de fatores pró-inflamatórios, pró-trombóticos e do estresse oxidativo (DEANFIELD et al., 2007), sendo incluídos a redução de L-arginina, da expressão e atividade da eNOS, elevados níveis de arginase (competidor por L-arginina), além da degradação do NO por EROS (WASSMANN et al., 2004).

As adipocinas pró-inflamatórias prejudicam a função endotelial pelo aumento da inflamação e estresse oxidativo em ratos (VILA; SALICES, 2005; DONATO et al., 2012) e em humanos (FORNONI; RAJI, 2005). Isso demonstra que altos níveis plasmáticos de TNF- α , ácidos graxos livres (AGL), leptina e resistina comprometem a vasodilatação dependente do endotélio, além do estado pró-inflamatório, pró-oxidativo e pró-trombótico associados a obesidade levarem a uma disfunção endotelial por efeito direto na redução da biodisponibilidade de NO (BENDALL et al., 2005; CHEN et al., 2010; MOHAMED et al., 1995).

Foi demonstrado que em indivíduos obesos, juntamente ao aumento de gordura visceral e do peso corporal há um aumento do depósito de PVAT (FITZGIBBONS et al., 2014), tornando-o disfuncional e em desequilíbrio com a imunidade inata, adaptativa e os padrões de secreção inflamatórios do indivíduo (CAO, 2014). Em modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica a massa total do PVAT está aumentada, com prejuízos na produção ou secreção de adipocinas, com redução de adiponectina (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005) e aumento na concentração de leptina, o que pode acelerar o processo de aterosclerose, aumentando o recrutamento de monócitos, estresse oxidativo (BOULOUMIE et al., 1999; SZASZ et al., 2012) e liberação de outras citocinas

aterogênicas como TNF- α , IL-6 e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), os quais induzem a inflamação e angiogênese, respectivamente (BERG; SCHERER, 2005; KNUTSON et al., 2005; KORDA et al., 2008). Assim, o PVAT na obesidade pode estar associado a complicações cardiovasculares por prejuízo do controle vascular (YUDKIN et al., 2005), podendo, nesses casos, ter uma redução no seu efeito anticonstrítil (ACHIKE et al. 2011).

2.4 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico aeróbio de moderada intensidade realizado continuamente é capaz de provocar uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais, principalmente no sistema cardiovascular, com o objetivo de manter a homeostase celular (MCADLE et al., 1998). O sedentarismo é o quarto maior fator de risco para mortes globais, sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças não-transmissíveis (entre elas: obesidade, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e diabetes *mellitus*). Assim, a prática regular de exercício físico tem sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo, sendo uma intervenção importante para saúde da população (OMS, 2010).

Na função endotelial, esses benefícios estão relacionados ao aumento na produção de substâncias vasoativas como o NO e/ou ao aumento de sua biodisponibilidade nas células endoteliais (WOODMAN et al., 2005; DELBIN et al., 2012). Pesquisas demonstram que o exercício aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil na parede vascular que traz uma melhora da resposta vasodilatadora relacionada ao aumento na produção e liberação de NO devido ao aumento da expressão da eNOS pela força de cisalhamento (*shear stress*) sob as células endoteliais (SESSA et al., 1994; DAVIS et al., 2003).

Esse mecanismo mediado pelo *shear stress* e aumento no fluxo laminar, ativa sensores mecânicos no glicocálice das células endoteliais, que sinaliza a liberação de substâncias vasodilatadoras pela ativação de canais de cálcio, liberando a PGI₂ e relaxando o músculo via AMPc. Junto a isso, acontece a ativação da via PI3K-Akt fosforilando a eNOS e aumentando a produção de NO e a resposta vasodilatadora. Essa força mecânica ainda é transmitida pelo citoesqueleto para locais de adesão, onde integrinas transmembranares ligadas a matriz extracelular

ativam proteínas quinases que liberam NF- κ B. Este por sua vez, liga-se as regiões promotoras de genes no núcleo, inclusive no gene da eNOS. O consequente aumento de NO pela força de cisalhamento promove uma resposta relaxante no músculo liso vascular e induz a uma maior expressão extracelular de superóxido dismutase (ecSOD), de maneira a inibir a degradação de NO por EROs e com isso, sem formar peroxinitrito (ONOO^-), extremamente lesivo a célula (GIELEN et al., 2010). Todo esse processo é esquematizado na figura 3.

Durante a prática do exercício físico há um aumento do consumo de oxigênio e ativação de vias metabólicas específicas que resultam no aumento da formação de EROS, porém, em seu efeito crônico, é capaz de criar adaptações adequadas em resposta a essa produção de EROS (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Foi demonstrado em estudos com humanos (Adams *et. al.*, 2005; Ennezat *et. al.*, 2001) e roedores (DURRANT et al., 2009; ZANCHI et al., 2008) que o exercício físico aumenta a expressão vascular de enzimas antioxidantes como a SOD, catalase e glutathione peroxidase e reduz a expressão e atividade da NAD(P)H oxidase e xantina oxidase. Dessa forma, adaptações cardiovasculares na resposta antioxidante promovidas pelo exercício físico podem melhorar a função endotelial através da redução de EROs e consequente aumento na biodisponibilidade de NO (DURRANT et al., 2009; LESNIEWSKI et al., 2011; JENDZJOWSKY; DELOREY, 2013; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Conforme relatado, apenas dois estudos avaliaram o papel do PVAT associado aos efeitos do treinamento físico e da dieta hiperlipídica, sendo desenvolvidos em artéria coronária circunflexa esquerda de porcos (REIFENBERGER et al., 2007; BUNKER; LAUGHLIN, 2010). Ambos trabalhos apresentam resultados funcionais de reatividade vascular e demonstraram alterações na resposta contrátil induzida apenas pela endotelina-1, porém os resultados são contraditórios quanto ao papel do exercício físico.

Em recente estudo desenvolvido em nosso laboratório, observamos que, em ratos saudáveis, o treinamento físico aeróbio por 8 semanas promoveu significativos efeitos na morfologia e na quantidade de PVAT aórtico, que foram associados com aumento na expressão das proteínas eNOS/pAMPK_{tre172}/mtTFA, sem alterações nas adipocinas do PVAT ou alterações na resposta moduladora deste tecido (ARAÚJO et al., 2015)

Os mecanismos pelos quais o exercício físico de moderada intensidade promove benefícios cardiovasculares e endócrino-metabólicos envolvem múltiplas vias de sinalização celular e molecular e despertam interesse em diversas linhas de pesquisa.

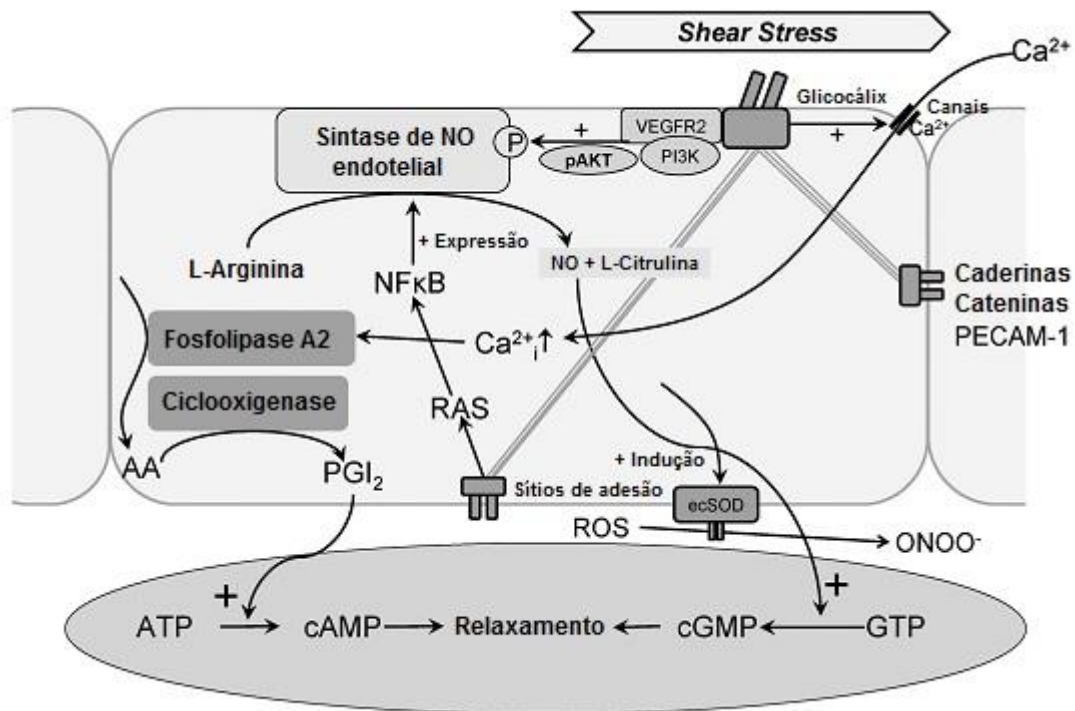


Fig. 3: Vias de sinalização mediadas pelo shear stress nas células endoteliais (adaptado de Gielen, et al. 2010). AA- ácido araquidônico; ATP- trifosfato de adenosina; cAMP- monofosfato cíclico de adenosina; cGMP- monofosfato cíclico de guanina; ecSOD- extracelular superóxido dismutase; EROs- espécies reativas de oxigênio; GTP- trifosfato de guanina; NF-kB- fator nuclear kappa B; NO- óxido nítrico; ONOO⁻-peroxinitrito; pAkt- proteína quinase B fosforilada; PGI₂- prostaciclina; PI3K- fosfatidil inositol 3-quinase; VEGFR2- receptor para fator de crescimento endotelial vascular.

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Apesar de estarem bem esclarecidos os efeitos benéficos do exercício físico na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, ainda encontram-se na literatura poucos estudos envolvendo o treinamento físico e seu efeito na função do PVAT. Alguns autores demonstraram uma diminuição da resposta relaxante dependente do endotélio especialmente em aorta torácica de ratos obesos (LI et al., 2007; LI et al., 2010; DENG et al., 2010; DIWAN et al., 2011), porém não utilizaram protocolos de treinamento físico e avaliação da resposta endotelial com a presença do PVAT. Com isso, até o momento apenas dois estudos avaliaram o papel do PVAT junto aos efeitos do treinamento físico e da dieta hiperlipídica, sendo desenvolvidos em artéria coronária circunflexa esquerda de porcos (REIFENBERGER et al., 2007; BUNKER e LAUGHLIN, 2010).

Como vimos, o PVAT modula a função vascular e na obesidade pode alterar seu padrão de secreção contribuindo para a disfunção vascular. Junto a isso, o exercício físico aeróbio auxilia na resposta vasodilatadora por aumentar a biodisponibilidade de NO. Desse modo, qual seria o papel do PVAT em animais obesos? Seria possível o treinamento físico interferir no padrão secretório do PVAT, prevenindo alterações vasculares induzidas pela obesidade? Qual seriam as possíveis vias de sinalização envolvidas?

Sendo assim, utilizando um modelo experimental de obesidade induzida pela dieta hiperlipídica em camundongos C57BL6/JUnib e o treinamento físico aeróbio moderado, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel do tecido adiposo perivascular na resposta relaxante e contrátil da aorta torácica e os possíveis mecanismos envolvidos.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do tecido adiposo perivascular na reatividade vascular de aorta torácica de camundongos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta relaxante e contrátil em anéis de aorta torácica, com endotélio intacto na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) de tecido adiposo perivascular:
 - Resposta relaxante a acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP);
 - Resposta contrátil ao análogo do tromboxano A2 (U46619) e endotelina (ET-1);
- Avaliar a expressão proteica em aorta torácica:
 - Sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) e sintase induzível de óxido nítrico (iNOS);
- Avaliar a expressão proteica no tecido adiposo perivascular:
 - Sintase endotelial de óxido nítrico (eNOS) e sintase induzível de óxido nítrico (iNOS);
- Avaliar a produção de óxido nítrico (NO) em aorta torácica PVAT+;
- Quantificar fatores circulantes:
 - Glicose, colesterol total, triglicerídeos, insulina, leptina, resistina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e adiponectina;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEUA-IB-UNICAMP-Protocolo: 3278-1).

Camundongos machos C57BL6/JUnib com quatro semanas de idade foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório-CEMIB) e foram mantidos no Biotério 1 da Área da Fisiologia do Instituto de Biologia da Unicamp em caixas coletivas com quatro animais em cada. Os animais com 6 semanas de idade (20-24 gramas) foram divididos nos seguintes grupos experimentais com início do controle da dieta (Figura 4):

1. Controle sedentário (c-SD): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com ração comercial controle e sedentários (n=20);
2. Controle treinado (c-TR): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com ração comercial controle e submetidos ao treinamento físico aeróbio (n=20);
3. Dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com dieta hiperlipídica e sedentários (n=20);
4. Dieta hiperlipídica treinado (dh-TR): camundongos C57BL6/JUnib alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico aeróbio (n=20).

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

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

O protocolo dos grupos experimentais é observado na figura 4, no qual se inicia a dieta de todos os animais com 6 semanas de idade e após 8 semanas os

grupos treinados (c-TR e dh-TR) iniciam o treinamento aeróbio durante as 8 semanas finais (mantendo a dieta específica de cada grupo). Enquanto o grupo sedentário (c-SD e dh-SD) também mantém a dieta específica por 16 semanas sem qualquer treinamento físico.

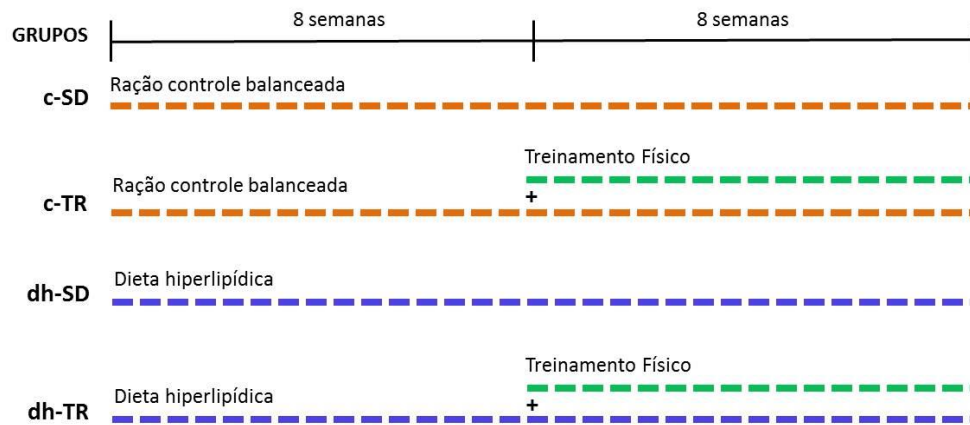


Fig. 4: Grupos experimentais.

5.2 PESO CORPORAL E CONSUMO ALIMENTAR

O peso corporal e consumo alimentar dos animais foram mensurados ao início do protocolo experimental e semanalmente até o final do estudo. Para avaliar o consumo alimentar foram pesadas as dietas no início e no final da semana. Com isso, analisamos aproximadamente a quantidade de dieta ingerida pelos animais subtraindo o peso final pelo peso inicial da dieta e com esse resultado dividimos pelo número de camundongos na caixa, obtendo um valor aproximado de g/camundongo/dia.

5.3 PROGRAMA DE TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento físico aeróbio realizado foi o de corrida em esteira ergométrica (Gesam, SP-Brasil), após 8 semanas da dieta específica para cada grupo. Uma semana antes do início do protocolo experimental os animais, sedentário e treinados, foram submetidos a um período de adaptação à esteira onde a velocidade imposta consistiu de aumentos progressivos variando a velocidade em 3 metros/minuto (m/min) no primeiro dia até 10 m/min no quinto dia da semana, e o tempo variando em 10 min no primeiro dia até 20 min no quinto dia. Somente os

animais adaptados à esteira foram utilizados neste estudo. Esta adaptação visou minimizar o possível estresse causado nos animais treinados (c-TR e dh-TR) devido ao uso da esteira e também expor os animais sedentários (c-SD e dh-SD) ao mesmo estresse do ambiente e da corrida.

Após o período de adaptação os grupos treinados (c-TR e dh-TR) iniciaram o programa de treinamento físico com intensidade moderada (60-70% da velocidade máxima atingida). Essa velocidade de treinamento foi calculada na primeira semana através da realização do teste de esforço máximo onde a velocidade da esteira foi aumentada em 3 m/min (iniciando em 5 m/min) a cada 3 minutos, 0% de inclinação até a exaustão, onde a velocidade máxima atingida foi calculada e utilizada para determinar a intensidade moderada de treino. O critério utilizado para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o camundongo não conseguiu correr mediante incremento da velocidade da esteira (BROOKS et al., 1978).

Após o teste de esforço máximo o treinamento físico foi iniciado com velocidade de 10 m/min aumentando progressivamente até atingir a velocidade final correspondente 60-70% da velocidade máxima estabelecida anteriormente para cada grupo experimental. Progressões de tempo na duração das sessões também foram realizadas até que os animais conseguissem permanecer correndo por 60 minutos. É importante salientar que os animais foram agrupados para o treinamento físico de acordo com a velocidade de treinamento. O programa teve duração total de 8 semanas de treinamento em esteira, 5 dias por semana, com duração de 60 min por sessão e velocidade da seguinte maneira: 10 min a 40% da velocidade máxima, 40 min a 60-70% da velocidade máxima e 10 min a 40% da velocidade máxima, 0% de inclinação e durante o período da manhã. (FERREIRA et al., 2007)

Para determinação da eficácia do treinamento ao final do protocolo, todos os animais, sedentários e treinados, foram submetidos ao teste de esforço máximo, onde o tempo total, distância total e velocidade máxima foram calculados.

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

5.4 MEDIDA DE GLICEMIA

A glicose sanguínea em jejum foi mensurada utilizando uma gota de sangue caudal e os valores foram constatados por fitas reativas de teste (Advantage Roche, SP, BRA) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche) seguindo as instruções do fabricante.

5.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO, AORTA E PVAT

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

Foram coletadas amostras de tecido adiposo branco da região epididimal, que foram pesadas para avaliação da indução de adiposidade, assim como outros pesquisadores usaram tecido adiposo branco (ROBERTS-TOLER; O'NEILL E CYPESS, 2015; COSTA et al., 2011). Também foram coletadas amostras da aorta torácica e do respectivo tecido adiposo perivascular (PVAT) para avaliação da expressão de proteínas.

5.6 CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA EM ANÉIS DE AORTA

A aorta torácica foi isolada e cortada em anéis (4 anéis de 2 milímetros cada) na ausência e na presença de tecido adiposo perivascular (PVAT-/PVAT+, respectivamente). Para isolar o PVAT e medir o comprimento de cada anel foi utilizado um microscópio e retículo micrométrico (Nikon Instruments, NY-EUA). Os anéis foram montados em sistema de miógrafo multicanaís para vasos de maior calibre (Model 610M, DMT A/S, Aarhus NA-Dinamarca) e todos foram mantidos em 5 ml da solução de Krebs aquecida a 37°C, pH 7,4 e areada com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. A tensão basal inicial foi de 5 miliNewton (mN) e as alterações de tensão do

tecido foram registradas em sistema PowerLab 400™ de aquisição de dados (Software versão 7,0, AD Instruments).

Após o período de 1 hora de estabilização, os anéis foram contraídos com solução de KCl 80 mM até a contração máxima, em seguida, foram lavados com solução de Krebs. Foi realizado teste para verificação do endotélio e apenas os anéis que apresentaram relaxamento superior a 60% da pré-contracção ao análogo do tromboxano A₂ foram utilizados no presente estudo. Curvas cumulativas de concentração-resposta com endotélio intacto em anéis PVAT- e PVAT+ aos vasodilatadores: acetilcolina (ACh; 1 nM-100 µM) e nitroprussiato de sódio (SNP; 100 pM-100 µM), foram obtidas. O relaxamento foi plotado como porcentagem da contração induzida pelo análogo do tromboxano A₂ (U46619, em concentração necessária para produzir 50%-80% da resposta máxima induzida pelo KCl).

Os efeitos contráteis do análogo do tromboxano A₂ (U46619; 1nM-10 µM) e da endotelina-1 (ET-1; 10 pM-100 nM) foram também avaliados. Os valores de contração foram plotados em mN por milímetro (mm) de artéria (mN/mm).

As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: resposta máxima que o agonista produz (E_{MAX}), concentração do agonista necessária para produzir metade da resposta máxima (log EC₅₀ - pEC₅₀) e coeficiente angular ou inclinação da curva concentração-resposta (n) foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA-EUA).

5.7 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN-BLOTTING

Amostras de aorta, assim como o seu respectivo PVAT foram coletadas e congeladas separadamente a -80°C, e posteriormente homogeneizadas (homogeneizador de vidro) em tampão de Ripa (Upstate, Temecula, CA-EUA). O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante recolhido para a determinação da concentração de proteína (Pierce BCA Protein Assay kit, IL-EUA), e então foi calculada para cada amostra a quantidade de 50 µg de proteína (aorta e PVAT) para aplicar no gel de acrilamida. As amostras foram aplicadas no gel com SDS (Lauril Sulfato Sódico) -poliacrilamida (SDS-PAGE, 4-15% Mini-Protean TGX – BioRad, CA-

EUA) e submetidas a eletroforese em um sistema Mini-Protean II (Elektrophoresis Cell, BioRad, CA-EUA).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF Hybond, Amersham Biosciences, NJ-EUA). Para a detecção das proteínas de interesse na aorta e no respectivo PVAT, as membranas foram incubadas com anticorpo primário por 12 horas para: sintase endotelial do óxido nítrico-eNOS e sintase induzível do óxido nítrico-iNOS (BD Biosciense, CA-EUA), utilizando as seguintes diluições: eNOS (1:750) e iNOS (1:500).

Em seguida, as membranas foram lavadas e posteriormente incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) correspondente ao primário em questão. Ao final as proteínas de interesse foram detectadas por uma reação de quimioluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Biosciences) e reveladas em fotodocumentador ImagemQuant LAS4000 (GE Healthcare, NY-EUA). Todo o protocolo de incubação foi repetido com anticorpo primário para detecção α -actina (1:20000, Abcam, MA-EUA) em aorta e α -tubulina (1:10000, Millipore, MA-EUA) no PVAT e respectivo anticorpo secundário. A expressão da α -actina e α -tubulina foi medida para normalização da expressão das proteínas quantificadas. O software ImageJ (National Institutes of Health, MD-EUA) foi utilizado para quantificação densitométrica das bandas.

Todos os resultados são apresentados como relativo ao grupo c-SD (a densitometria do grupo c-SD para cada proteína foi estabelecida como sendo igual a 1 e a partir deste valor a densitometria dos demais grupos foi calculada).

5.8 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM AORTA TORÁCICA

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

O ensaio foi realizado em um anel de aorta torácica PVAT+ de aproximadamente 6 mm imerso em meio para congelamento Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek Inc., Torrance, EUA), e então criosecções de 10 μ m de espessura

foram obtidas em criostato a -25°C . Entre 2-3 cortes de cada amostra foram colocados sobre lâminas com silanina e incubados com 100 μl de tampão fosfato 0,1M (pH=7,4) contendo cálcio (0,45mM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C . Posteriormente, uma nova incubação foi realizada com tampão fosfato e DAF-2 (8 μM) por 30 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação “basal”. Um segundo corte da mesma amostra foi incubado com o mesmo tampão (contendo cálcio e DAF-2), porém após 15 minutos de incubação foi acrescentado 30 μM de acetilcolina e a incubação permaneceu por mais 15 minutos em câmara úmida (37°C) ao abrigo da luz, o que caracterizou a incubação ACh. As imagens foram captadas em microscópio óptico (Eclipse 80i, Nikon, Japan), utilizando-se objetiva 10X acoplada a uma câmara fotográfica (DS-U3, Nikon). Para a fluorescência de DAF-2 utilizamos o filtro de fluoresceína e sua quantificação foi realizada utilizando o Software ImageJ 1.46p (NIH, EUA). Mediu-se a densidade integrada em 10 regiões aleatórias de cada corte com área fixa e a média desses valores foi considerada a medida final de cada amostra. A quantificação da produção de NO pela fluorescência de DAF-2 foi apresentada pela diferença entre a intensidade densitométrica após estímulo com 30 μM de ACh e a intensidade densitométrica do basal. Os dados de fluorescência ao DAF-2 foram normalizados relativamente aos dados do grupo controle (c-SD), para os quais foi atribuído um valor médio igual a 1.

5.9 DETERMINAÇÃO DE FATORES BIOQUÍMICOS SÉRICOS E RESISTÊNCIA À INSULINA

As amostras de soro guardadas a -80°C , como citada no item 5.5, foram utilizadas para avaliar os níveis séricos de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), que foram medidos pelo método enzimático utilizando-se kit específico (Katal, MG-Brasil) e análise no espectrofotômetro.

Foram utilizadas amostras de soro para a determinação das concentrações de leptina, adiponectina, resistina e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelo método de ELISA utilizando kit comercial (R&D Systems, MN-EUA). Adiponectina de alto peso molecular foi determinada através de kit comercial ELISA (Alpco, NH-EUA). Também foi utilizado kit ELISA para avaliação da insulina sérica (Millipore Corporation, MA-EUA).

A partir dos dados de glicemia e insulina de jejum, verificou-se indiretamente a resistência à insulina por meio do índice *Homeostasis Model Assessment* (HOMA-RI), calculado conforme previamente descrito (MATTHEWS et al., 1985).

Por fim, foram utilizadas amostras de soro para avaliar a peroxidação lipídica utilizando kit comercial colorimétrico (Cayman, USA) através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é determinada a partir de um padrão de malondialdeído (MDA).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. Para a análise de variância entre os grupos experimentais foi utilizada ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni; e para análise intra-grupos (PVAT+ versus PVAT-) foi utilizado o Test t de *Student* não pareado, ambas através do programa GraphPad Prism (GraphPad Software) e identificadas em cada caso. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6 RESULTADOS

6.1 TESTE DE EXAUSTÃO E EFICÁCIA DO PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Ao início do protocolo de treinamento físico todos os animais apresentaram resultados similares para as variáveis (tempo, distância percorrida e velocidade máxima) analisadas no teste de esforço máximo (Figura 5). A intensidade do treinamento em esteira dos grupos c-TR e dh-TR foi estabelecida após o teste de esforço máximo. Podemos observar que o grupo c-TR apresentou velocidade máxima de 0,44 m/s (26 m/min) e o grupo dh-TR velocidade máxima de 0,41 m/s (25 m/min) (Figura 5, painel C). Assim, estabelecemos a intensidade moderada para o treino (60-70% da velocidade máxima atingida no teste) entre 0,26 a 0,31 m/s (16 a 18 m/min).

Ao final do protocolo experimental observamos aumento de 103,8% do tempo total, 275% da distância total percorrida e 93,9% da velocidade máxima de exaustão no grupo c-TR comparado ao grupo c-SD. Também observamos aumento 60,6% do tempo final, 140% da distância percorrida e 52,9% de velocidade máxima de exaustão no dh-TR comparado ao grupo dh-SD. Demonstrando a eficácia do treinamento físico aeróbio empregado neste estudo.

Nota-se que o grupo dh-TR apresentou um menor tempo final, distância percorrida e velocidade máxima atingida (redução de 25,9%; 56,8% e 23% respectivamente) comparado ao grupo c-TR (figura 5).

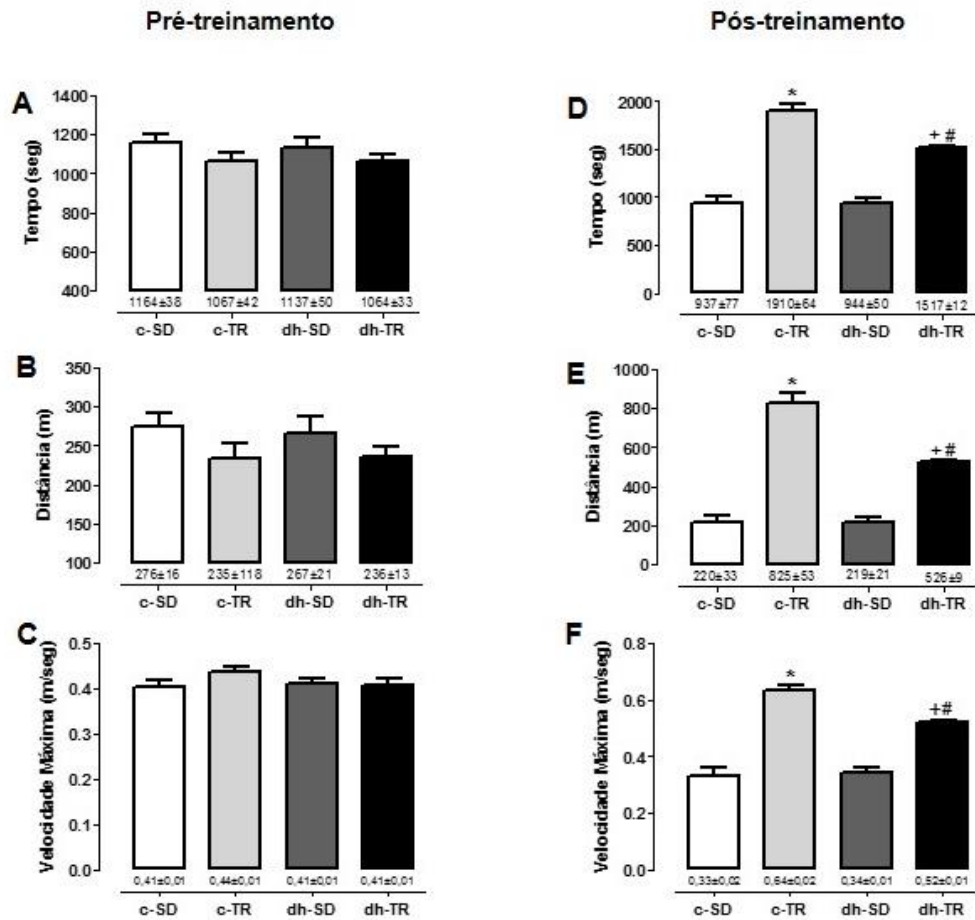


Fig. 5: Teste de esforço máximo pré-treinamento: tempo total (segundos, painel A), distância total (metros, painel B) e velocidade máxima (m/s, painel C). Teste de esforço máximo pós-treinamento: tempo total (segundos, painel D), distância total (metros, painel E) e velocidade máxima (m/s, painel F). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; + $p < 0,05$ comparado ao dh-SD; # $p < 0,05$ comparado ao c-TR. N = 7 a 12 animais.

6.2 PESO CORPORAL E DO TECIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL

O peso no início do protocolo experimental foi similar em todos os grupos (Figura 6, painel A). Conforme esperado, após dezesseis semanas de dieta hiperlipídica os animais dos grupos dh-SD e dh-TR apresentaram aumento do peso corporal (aproximadamente 70%) e do acúmulo de tecido adiposo epididimal (aproximadamente 360%) quando comparados aos grupos c-SD e c-TR (Figura 6, painel B e C), demonstrando assim a eficácia da dieta escolhida em induzir obesidade. Também observamos um aumento do peso do tecido adiposo epididimal quando normalizado pelo peso corporal (Figura 6, painel D).

O treinamento físico aeróbio no grupo dh-TR não apresentou efeito significativo tanto para redução do peso corporal, como do tecido adiposo epididimal no grupo dh-TR quando comparado ao grupo dh-SD (Figura 6, painel B, C e D).

Os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior ingesta calórica comparados aos seus respectivos grupos controles, (Figura 6, painel E). Em contraste, é interessante salientar que o consumo alimentar (em gramas de alimento/animal/dia) foi menor nos grupos dh-SD ($2,9 \pm 0,1$) e dh-TR ($2,7 \pm 0,1$), quando comparados aos grupos c-SD ($3,9 \pm 0,1$) e c-TR ($3,5 \pm 0,1$), respectivamente (Figura 6, painel F).

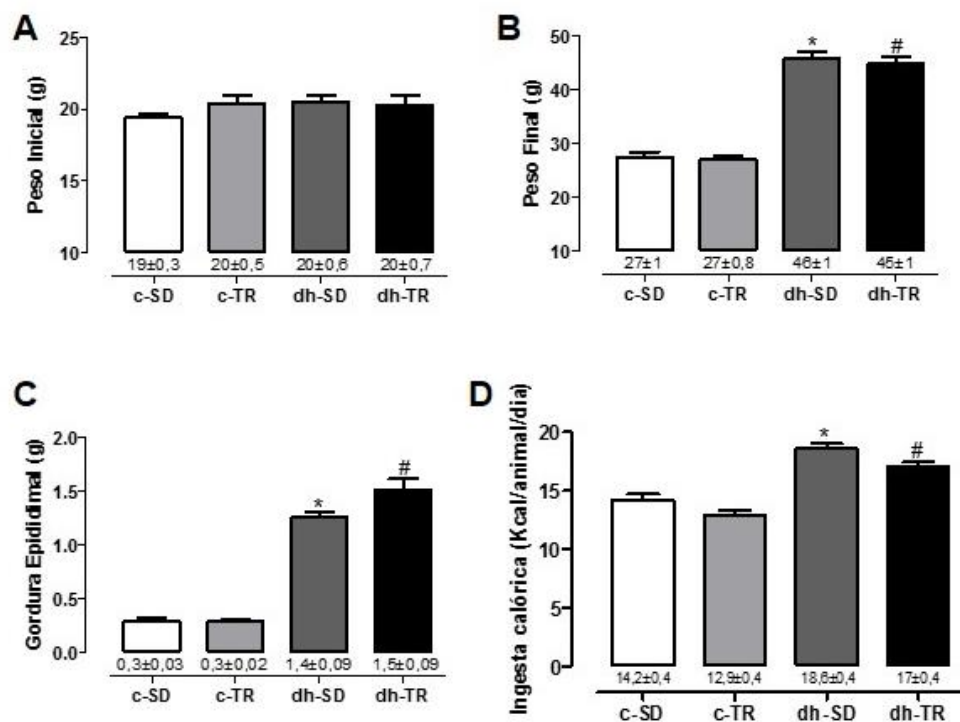


Fig. 6: Peso inicial (gramas, painel A), peso final (gramas, painel B), peso do tecido adiposo epididimal (gramas, painel C) e ingesta calórica (Kcal/animal/dia, painel D). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; # $p < 0,05$ comparado ao c-TR. N = 7 a 12 animais.

6.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RESISTÊNCIA À INSULINA

Observamos um aumento na concentração de glicose, insulina sérica (aproximadamente 85%) e do índice HOMA-RI (aproximadamente 80%) no grupo dh-SD comparado ao c-SD (Figura 7, painéis A, B e C respectivamente). É interessante notar que houve uma redução nos níveis de insulina (aproximadamente

60%) e do índice HOMA-RI (aproximadamente 67%) no grupo dh-TR em relação ao dh-SD (Figura 8, painéis A e B respectivamente).

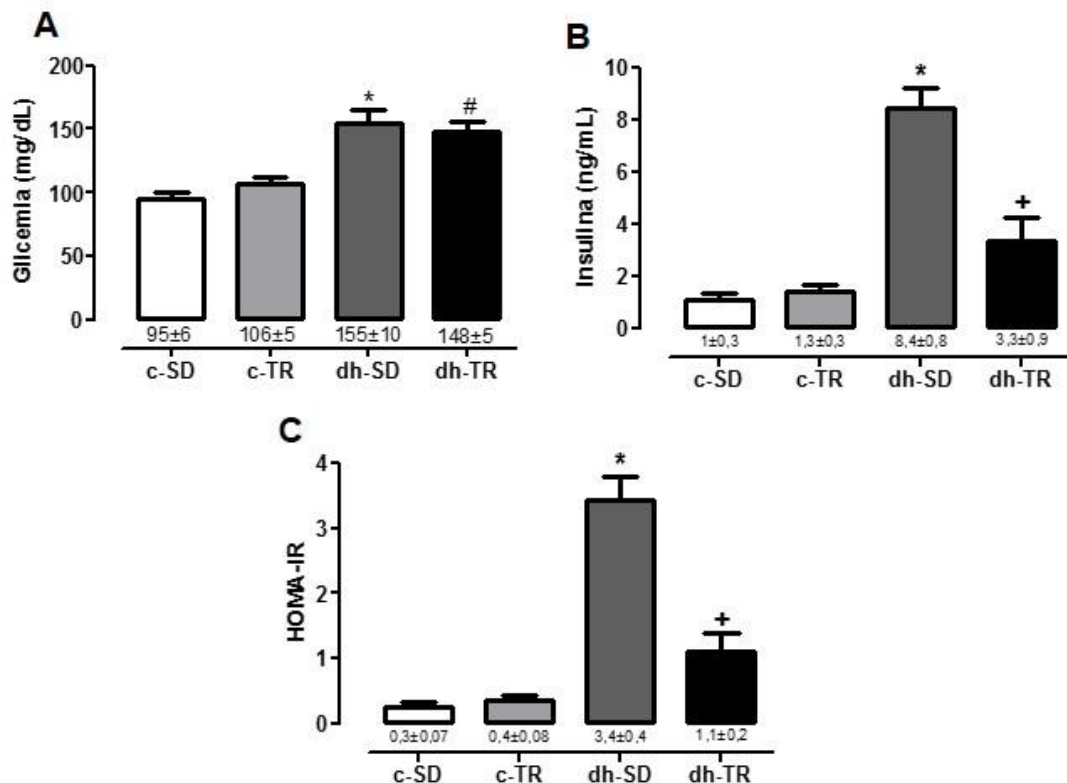


Fig. 7: Glicemia (mg/dL, painel A), insulina (ng/mL, painel B) e índice HOMA-IR (painel C). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; # $p < 0,05$ comparado ao c-TR. N = 7 a 12 animais.

Também notamos que os níveis de colesterol total e triglicerídeos dos camundongos ao fim do protocolo experimental mostraram-se elevados nos grupos dh-SD e dh-TR quando comparados aos grupos c-SD e c-TR, respectivamente (Figura 87, painéis A e B), demonstrando assim significativas alterações no perfil lipídico induzidas pela obesidade. O treinamento físico aeróbico no grupo dh-TR não apresentou efeito significativo para redução dos parâmetros avaliados quando comparado ao grupo dh-SD.

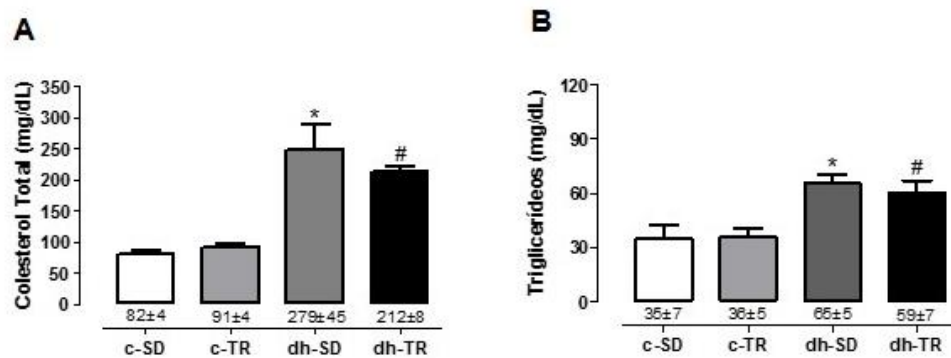


Fig. 8: Colesterol total (mg/dL, painel A) e Triglicerídeos (mg/dL, painel B). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; # $p < 0,05$ comparado ao dh-S. N = 7 a 10 animais.

Os valores circulantes de leptina, resistina e TNF- α dos animais ao final do protocolo, se apresentaram elevados no grupo dh-SD quando comparado ao grupo controle c-SD. O treinamento físico no grupo dh-TR apresentou efeito significativo apenas na redução dos valores de TNF- α quando comparado ao grupo dh-SD (Figura 9, painel C). Entretanto, nenhuma alteração foi observada nos valores de adiponectina total e adiponectina de alto peso molecular para todos os grupos estudados (Figura 10, painéis A e B, respectivamente).

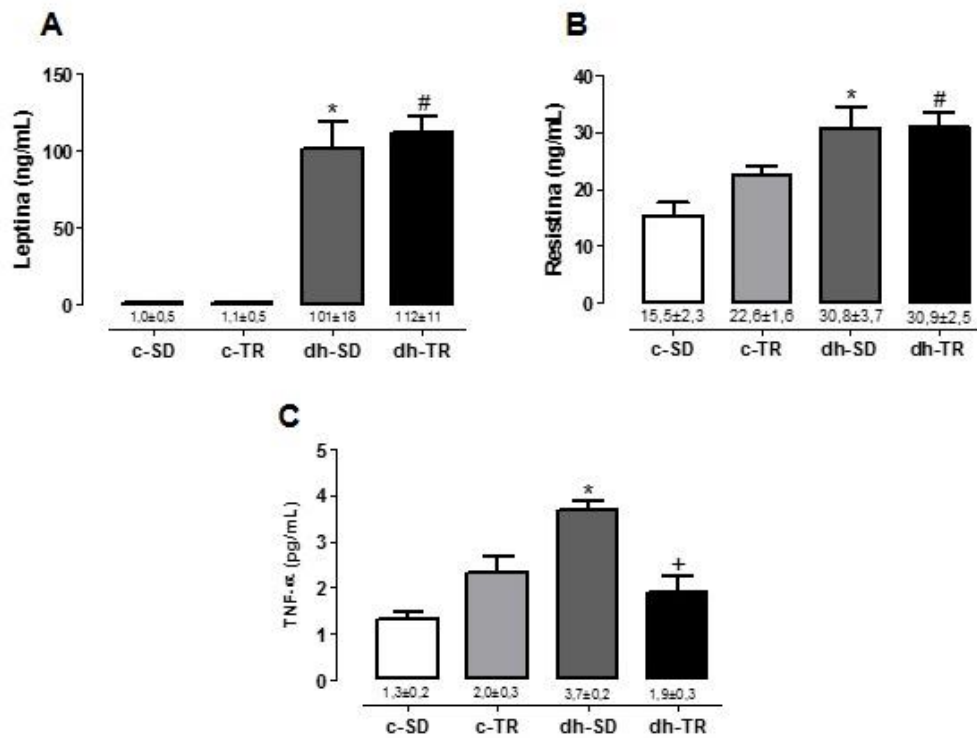


Fig. 9: Leptina (ng/mL, painel A), Resistina (ng/mL, painel B) e TNF-alfa (pg/mL). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * p < 0,05 comparado ao c-SD; + p < 0,05 comparado ao dh-SD; # p < 0,05 comparado ao c-TR. N = 7 a 12 animais.

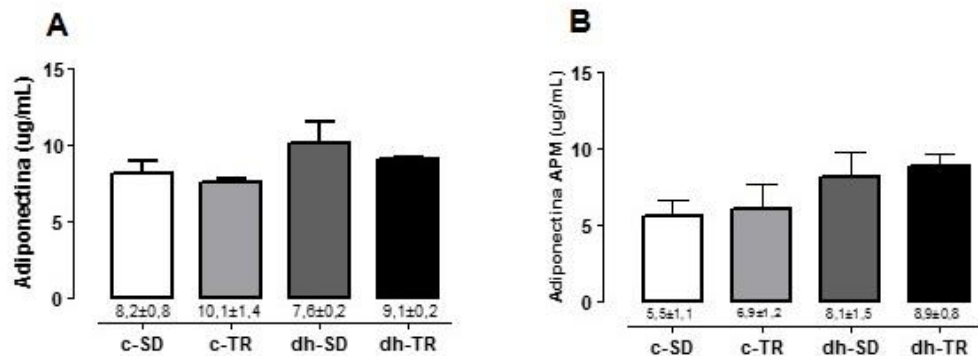


Fig. 10: Adiponectina total (ug/mL, painel A) e adiponectina de alto peso molecular (ug/mL, painel B). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni. N = 7 a 12 animais.

Em relação a produção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) verificamos que os animais do grupo dh-SD apresentaram aumento nos níveis séricos de MDA (aproximadamente 42%), comparado ao grupo c-SD. Esta alteração não foi verificada quando comparamos o grupo dh-TR e c-TR (Figura 11).

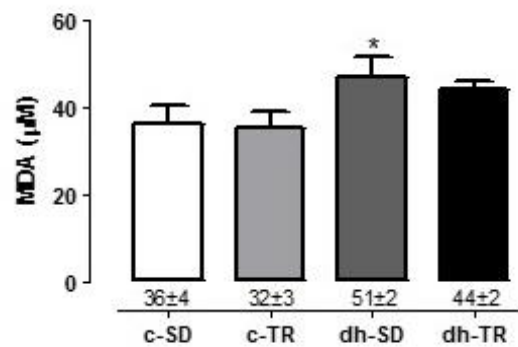


Fig. 11: Níveis séricos de malondialdeído (μM). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD. N = 7 a 12 animais.

6.4 REATIVIDADE VASCULAR EM AORTA

Inicialmente, assim como o peso corporal e a gordura epididimal, observamos um aumento do peso do PVAT normalizado pelo comprimento do anel de aorta nos grupos dh-SD e dh-TR (aproximadamente 320% e 300%, respectivamente) quando comparados aos grupos c-SD e c-TR (Figura 12, painel A). Também notamos aumento (57% e 67% respectivamente) quando normalizamos o peso do PVAT pelo comprimento do anel de aorta e pelo peso corporal (Figura 12, painel B), comparando os grupos dh-SD com c-SD e dh-TR com c-TR.

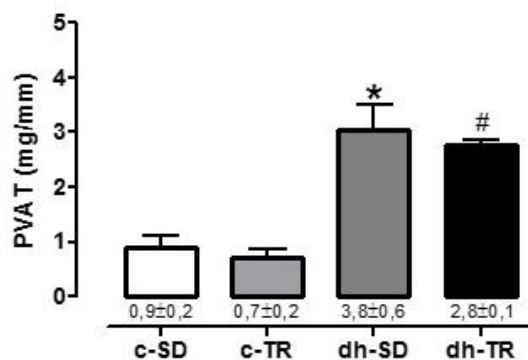


Fig. 12: Peso do PVAT (mg/mm, painel A). Grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± EPM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD e # $p < 0,05$ comparado ao c-TR. N = 7 a 12 animais.

Além disso, previamente não foram observadas diferenças no delta de contração máxima induzida pelo KCl 80 mM nos anéis PVAT+ comparados aos anéis PVAT- (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de delta da contração máxima induzida pelo cloreto de potássio 80 mM (Δ KCl, mN/mm) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

GRUPOS - Δ KCl (mN/mm)				
	c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
PVAT+	12 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
PVAT-	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1

Valores expressos como média $\pm$ EPM. Test t de *Student*. N = 7 a 12 animais.

Os agonistas acetilcolina (ACh; 1 nM-100 μ M) e nitroprussiato de sódio (SNP; 100 pM- 100 μ M) produziram relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta torácica com endotélio intacto, PVAT- e PVAT+.

A presença do PVAT não alterou os valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{MAX}) a ACh nos grupos c-SD e c-TR, quando comparados aos respectivos anéis PVAT- (Figura 13, painel A e B, respectivamente e Tabela 2). Porém, anéis PVAT+ do grupo dh-SD apresentaram redução da E_{MAX} (aproximadamente 14%) e pEC_{50} (aproximadamente 2,3 vezes) a ACh quando comparados aos seus respectivos anéis PVAT- (Figura 13, painel C e Tabela 2). Esta alteração não foi observada no grupo dh-TR PVAT+ comparado ao seu respectivo anel PVAT- (Figura 12, painel D e Tabela 2). Não foram observadas alterações na pEC_{50} e E_{MAX} ao SNP em anéis PVAT+ comparados aos anéis PVAT- para todos os grupos experimentais (Figura 14, Tabela 2).

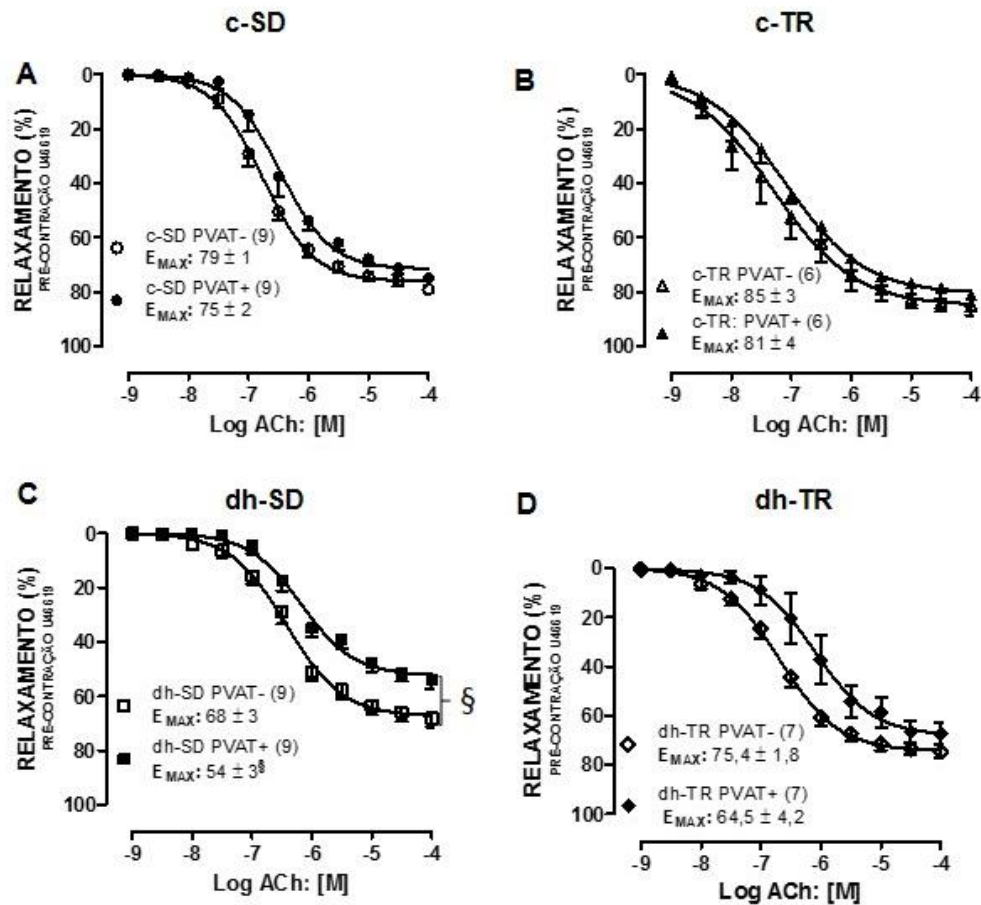


Fig. 13: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Test t de *Student*. $\S$ comparado ao respectivo grupo PVAT-. N = 6 a 8 animais.

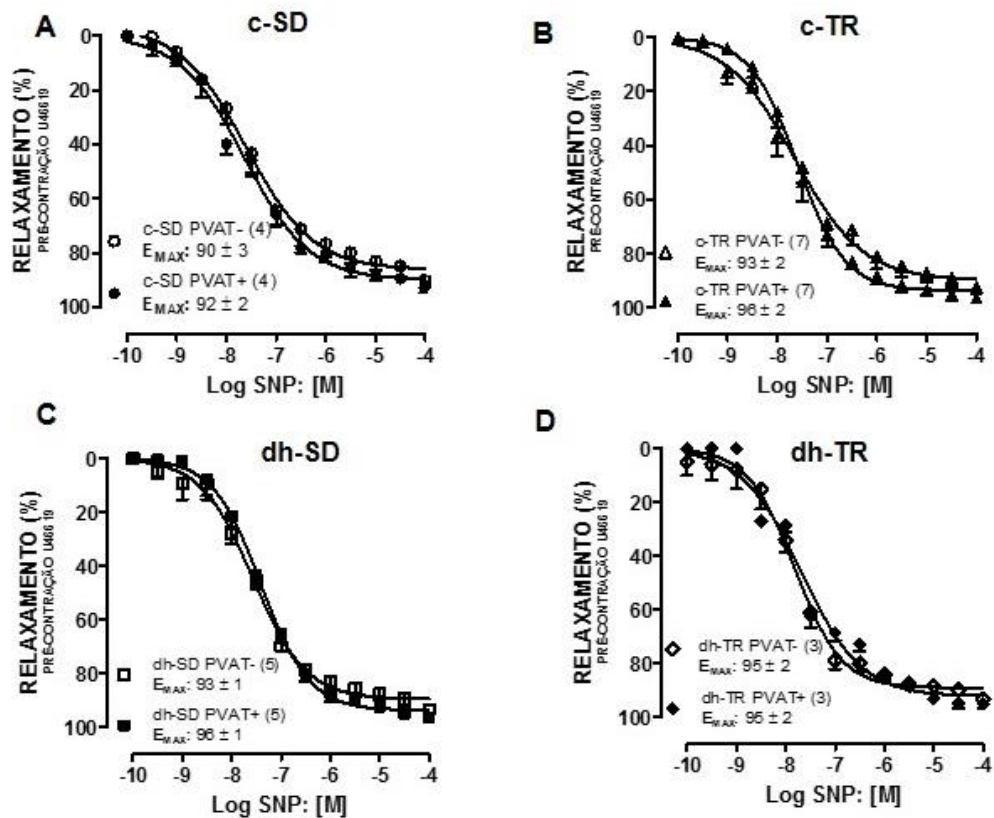


Fig. 14: Curvas concentração-resposta ao Nitroprussiato de Sódio (SNP) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Test t de *Student*. N = 6 a 8 animais.

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

Grupos - pEC_{50}					
		c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
ACh	PVAT-	6,70 ± 0,07	7,35 ± 0,17	6,46 ± 0,09	6,61 ± 0,05
	PVAT+	6,60 ± 0,10	7,21 ± 0,15	6,07 ± 0,14 [§]	6,83 ± 0,25
SNP	PVAT-	7,53 ± 0,16	7,61 ± 0,15	7,57 ± 0,06	7,55 ± 0,25
	PVAT+	7,65 ± 0,10	7,61 ± 0,12	7,41 ± 0,04	7,68 ± 0,08

Valores de potência são representados como -log da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima. Valores expressos como média ± EPM. Test t de *Student*. § comparado ao respectivo grupo PVAT-. N = 6 a 8 animais.

O agonista análogo do tromboxano A_2 (U46619, 1nM- 3 μ M) produziu contração concentração dependente em anéis de aorta torácica com endotélio intacto, PVAT- e PVAT+. Por outro lado, discreta contração foi apresentada pela endotelina (ET-1, 100 pM- 300 nM).

Nenhuma alteração foi observada nos valores de pEC_{50} e E_{MAX} aos agonistas U46619 e ET-1 em anéis PVAT+ comparados aos anéis PVAT- para todos os grupos experimentais (Figura 15 e 16, respectivamente e Tabela 3).

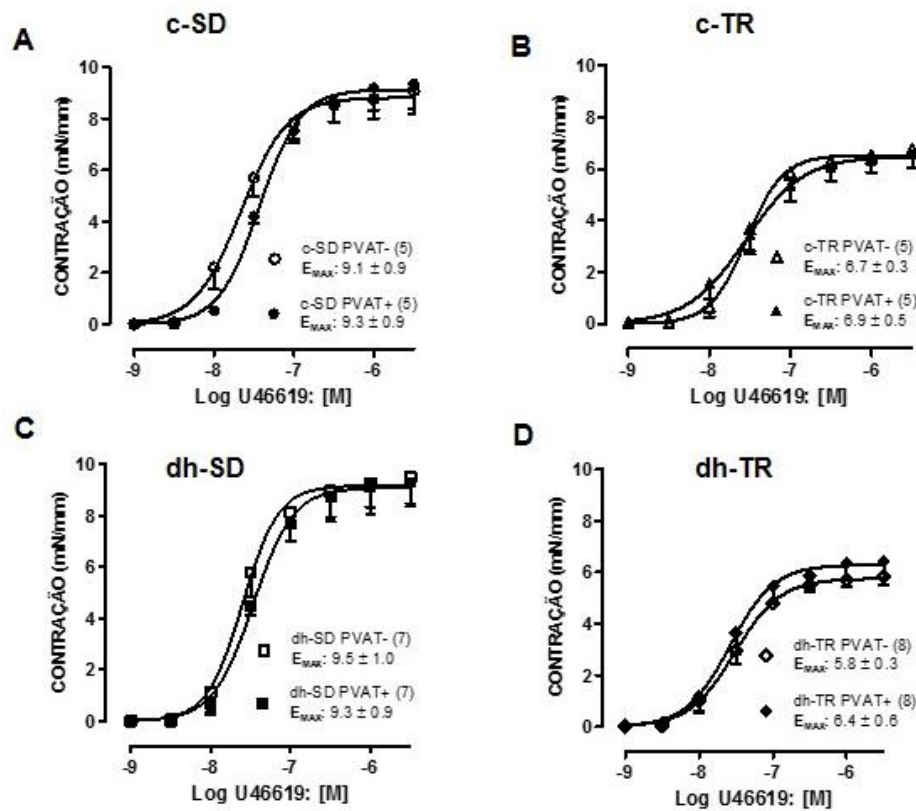


Fig. 15: Curvas concentração-resposta ao Análogo do Tromboxano A2 (U46619) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Test t de *Student*. N = 5 a 8 animais.

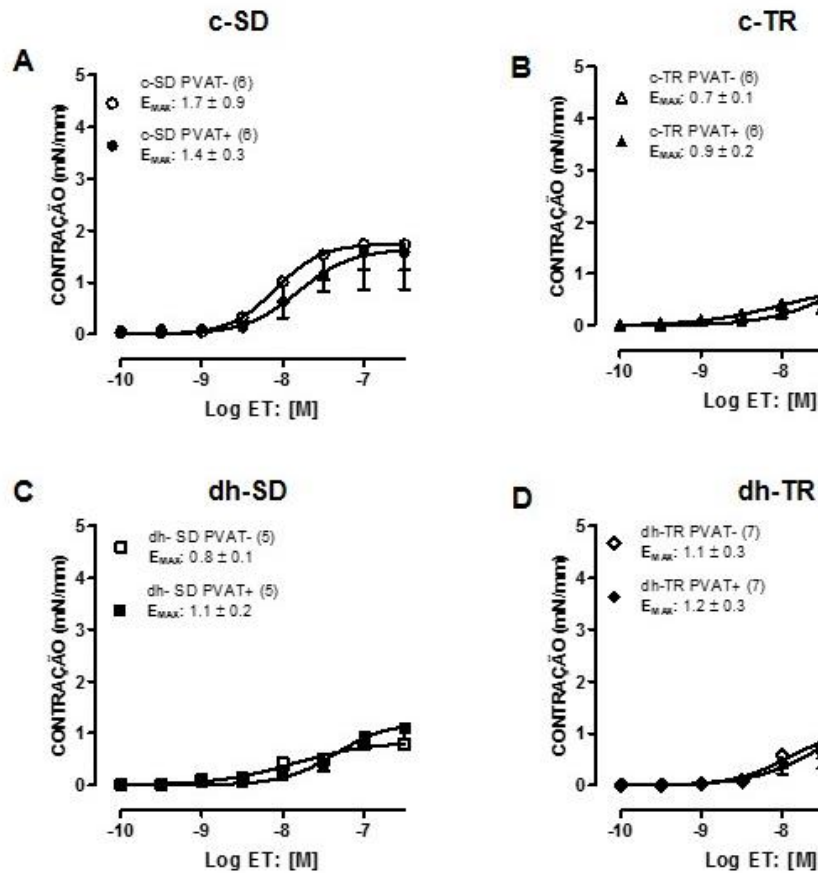


Fig. 16: Curvas concentração-resposta a Endotelina (ET1) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-, símbolos abertos) ou na presença (PVAT+, símbolos fechados) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Test t de *Student*. N = 5 a 7 animais.

Tabela 3: Valores de potência (pEC_{50}) obtidos a partir de curvas concentração resposta ao Análogo do Tromboxano A2 (U46619) e à Endotelina (ET1) em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de camundongos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

		Grupos - pEC_{50}			
		c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
U46619	PVAT-	7,69 $\pm$ 0,09	7,55 $\pm$ 0,09	7,61 $\pm$ 0,05	7,56 $\pm$ 0,11
	PVAT+	7,44 $\pm$ 0,06	7,56 $\pm$ 0,15	7,40 $\pm$ 0,08	7,58 $\pm$ 0,09
ET-1	PVAT-	8,21 $\pm$ 0,06	7,82 $\pm$ 0,23	8,11 $\pm$ 0,21	7,92 $\pm$ 0,23
	PVAT+	7,84 $\pm$ 0,12	7,48 $\pm$ 0,12	7,61 $\pm$ 0,15	7,71 $\pm$ 0,20

Valores de potência são representados como $-\log$ da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Test t de Student. N = 6 a 8 animais.

6.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

Em amostras de aorta torácica, observamos um aumento (aproximadamente 50%) na expressão da proteína eNOS no grupo dh-TR comparado ao dh-SD (Figura 17, painel A). Contudo, não houve alteração na expressão da proteína iNOS.

No PVAT, a expressão da proteína iNOS apresentou aumento significativo no grupo dh-SD (aproximadamente 70%) em comparação ao grupo c-SD. Esta alteração não foi observada no grupo dh-TR comparado ao grupo c-TR (Figura 17, painel D). Não observamos alterações nas expressões da eNOS, (Figura 17, painel C).

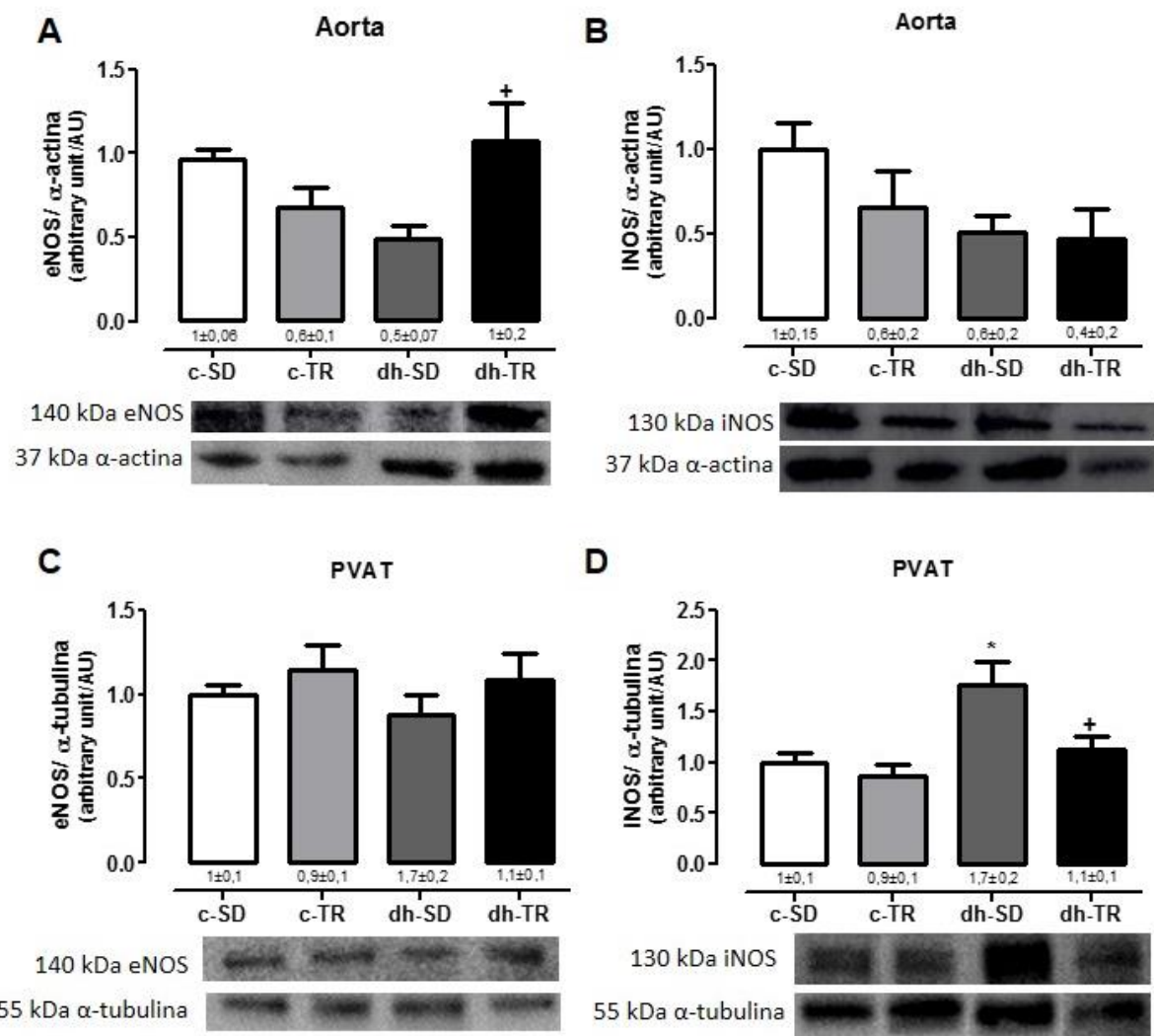


Fig. 17: Expressão proteica de eNOS (painel A) e iNOS (painel B) em aorta torácica; eNOS (painel C) e iNOS (painel D) no PVAT dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). Valores expressos como média ± SEM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD e + $p < 0,05$ comparado ao dh-SD. N = 6 a 10 animais.

6.6 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de óxido nítrico (NO), avaliada pela fluorescência emitida por diaminofluoresceína (DAF-2 – 8μM) em cortes transversais de aorta torácica PVAT+, após estímulo com ACh (30μM), apresentou redução significativa no grupo dh-SD em comparação com o grupo c-SD e o treinamento físico reverteu essa alteração (Figura 18, painel A).

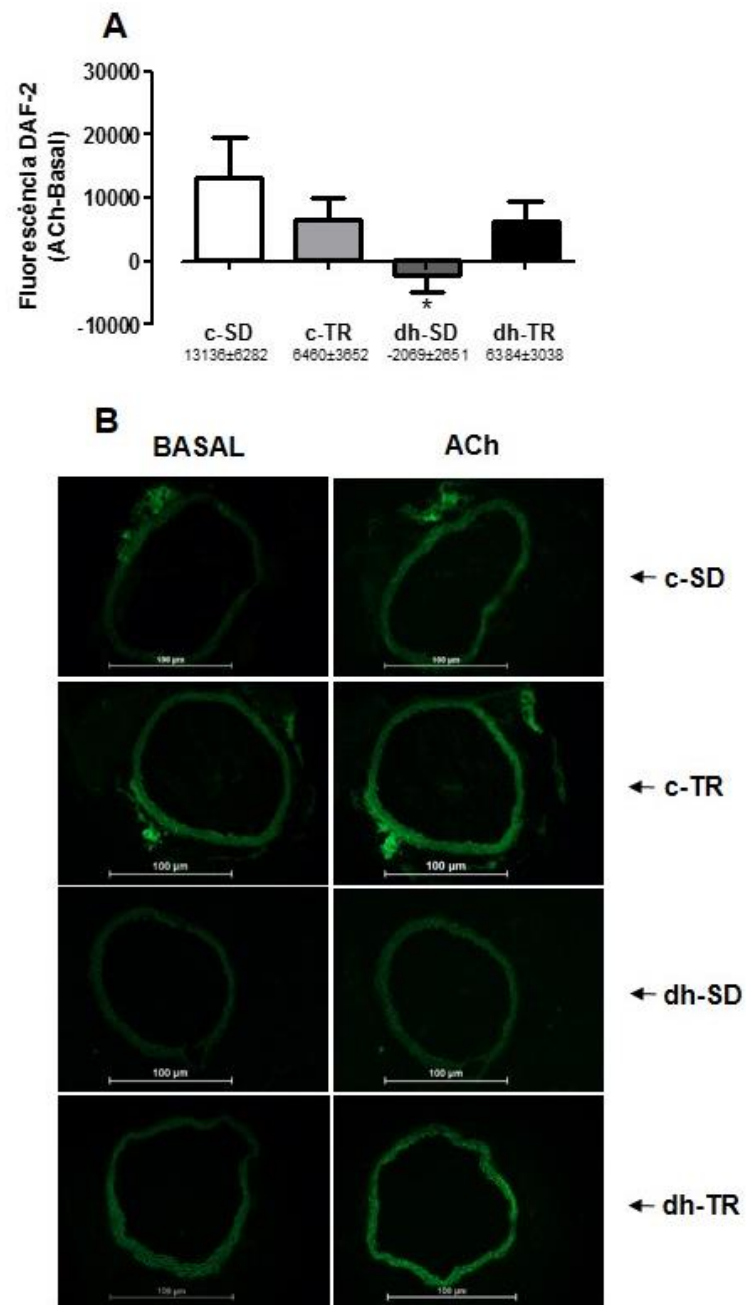


Fig. 18: Análise da biodisponibilidade de NO através de fluorescência com corante sensível ao NO: 4,5-diaminofluorece (DAF-2) (painel A e C) de seções de aorta torácica. DAF-2 foi avaliado na presença de acetilcolina (ACh, 30nM). 2-way ANOVA. Escala= 100 μ m. N= 5 a 9 animais.

7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Principais alterações gerais encontradas no estudo, sendo as comparações realizadas da seguinte forma:

	c-TR	dh-SD	dh-TR
Tempo de Exaustão	↑ 103,8% comparado ao c-SD	↔	↑ 60,6% comparado ao dh-SD e ↓ 25,9% comparado ao c-TR
Distância de Exaustão	↑ 275% comparado ao c-SD	↔	↑ 140% comparado ao dh-SD e ↓ 56,8% comparado ao c-TR
Velocidade de Exaustão	↑ 93,9% comparado ao c-SD	↔	↑ 52,9% comparado ao dh-SD e ↓ 23% comparado ao c-TR
Peso Corporal	↔	↑ 70% comparado ao c-SD	↑ 70% comparado ao c-TR
Gordura Epididimal	↔	↑ 78,5% comparado ao c-SD	↑ 78,5% comparado ao c-TR

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

Principais alterações na reatividade vascular encontradas, sendo as comparações realizadas da seguinte forma:

Sumário dos resultados- Reatividade Vascular					
		c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
Resposta Vasodilatadora (ACh)	PVAT+ comparado ao PVAT-	↔	↔	↓ 14%	↔
Resposta Vasodilatadora (SNP)	PVAT+ comparado ao PVAT-	↔	↔	↔	↔
Resposta Vasoconstritora (U46619 e ET-10)	PVAT+ comparado ao PVAT-	↔	↔	↔	↔

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

Principais alterações na expressão de proteínas encontradas, sendo as comparações realizadas da seguinte forma:

PVAT	c-TR	dh-SD	dh-TR
Peso PVAT	↔	↑ 320% comparado ao c-SD	↑ 300% comparado ao c-TR
Expressão proteica iNOS	↔	↑ 70% comparado ao c-SD	↔
Expressão proteica eNOS	↔	↔	↔
AORTA	c-TR	dh-SD	dh-TR
Expressão proteica iNOS	↔	↔	↔
Expressão proteica eNOS	↓40% comparado ao c-SD		↑ 50% comparado ao dh-SD

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

Principais alterações na avaliação da produção de NO em secção de aorta torácica, sendo as comparações realizadas da seguinte forma:

AORTA	c-TR	dh-SD	dh-TR
Produção de NO (DAF-2)	↔	Redução comparado ao c-SD	↔

Legenda: ↔sem alteração.

8 DISCUSSÃO

Trabalhos que envolvem a indução da obesidade em modelos animais mostram-se úteis nas pesquisas devido a sua grande semelhança com a gênese e as respostas metabólicas decorrentes do sobrepeso/obesidade em humanos (WEST; YORK, 1998; TSCHOP; HEIMAN, 2001). Especificamente o modelo de indução de obesidade por dieta hiperlipídica em camundongos C57BL6/J está bem estabelecido, sendo uma ferramenta útil no estudo dos efeitos da obesidade (ROBERTS-TOLER, 2015; COSTA, 2011; YANG, 2007).

Foi demonstrado neste estudo que camundongos sedentários e alimentados por dezesseis semanas com dieta hiperlipídica apresentaram características da obesidade, como o aumento do peso corporal e acúmulo de gordura epididimal, acompanhado por significativas alterações metabólicas, inflamatórias e vasculares. As concentrações circulantes de glicose, colesterol total, triglicerídeos, insulina, leptina, resistina e TNF- α apresentaram-se elevados nesses animais. Na aorta torácica observamos que a presença do tecido adiposo perivascular (PVAT) reduziu o relaxamento dependente do endotélio, associado com redução na produção de NO vascular e aumento da expressão da iNOS no PVAT. Por outro lado, o treinamento físico aeróbio foi eficaz em reduzir os valores circulantes de TNF- α e normalizar as alterações vasculares observadas, independente de alterações no peso corporal e gordura epididimal.

O exercício físico aeróbio de moderada intensidade, realizado continuamente, está associado à promoção de saúde, melhora na função cardiovascular e retardo das complicações associadas ao envelhecimento em animais saudáveis (JUDGE *et al.*, 2005; GARCIA-VALLES *et al.*, 2013). Dessa forma, a prática regular de exercício físico tem sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE-OMS, 2010).

8.1 ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS

A distribuição da gordura corporal exerce grande influência nas anormalidades associadas à obesidade, tais como alterações no metabolismo glicêmico e lipídico, sendo estas mais encontradas em condições que exista

obesidade central (abdominal) (LAFONTAN; LANGIN, 2009). A ingestão de dieta hiperlipídica está associada à resistência à insulina, com consequente hiperinsulinemia e desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 (CINTRA et al., 2008; PRADA et al., 2009). Alguns estudos envolvendo modelo de obesidade em camundongos induzida por dieta hiperlipídica reportam que o exercício físico aeróbio foi eficaz em promover redução no ganho de peso corporal e do acúmulo de gordura, além de melhorar o perfil glicêmico e lipídico (BRADLEY, 2008; FARIAS et al., 2012; CINTRA et al., 2008; RAO et al., 2013). Porém, assim como em nosso estudo, outros trabalhos demonstraram que o treinamento físico aeróbio não promoveu redução do peso corporal, gordura total, gordura visceral, colesterol total e triglicerídeos (BORG et al., 2012; KAWANISHI et al., 2013; SAMAN et al., 2014; SUGA et al., 2014).

Essas diferenças citadas podem estar relacionadas ao grau de obesidade nos animais, ao tempo de indução da obesidade e também ao protocolo de treinamento físico empregado. Sabe-se que o exercício físico produz efeito direto no nível metabólico, podendo modular o ganho de peso corporal por estar relacionado ao aumento do gasto energético, aumento da atividade simpática, ativação de receptores beta-adrenérgicos, aumento da beta-oxidação na mitocôndria (LJUBICIC et al., 2010; THOMPSON et al., 2012; SAKURAI et al., 2013). Entretanto, qualquer aumento do gasto energético alcançado com o exercício físico moderado pode ser revertido pelo consumo crônico da dieta hiperlipídica, e com isso, torna-se pouco expressivo na redução do peso corporal nos animais obesos (TROMBETTA, 2003). Conforme observamos, a ingesta calórica permanece elevada nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica durante todo protocolo experimental. Assim, sugerimos que uma intervenção envolvendo exercício físico aeróbio e controle alimentar possa apresentar resultados mais eficientes no controle do peso corporal e redução da gordura epididimal.

Como dito anteriormente, a ingestão de dieta hiperlipídica também está associada à resistência à insulina (CINTRA et al., 2008; PRADA et al., 2009). O modelo de avaliação da homeostase da insulina (HOMA-RI) pode ser considerado um marcador de resistência à insulina com um alto valor preditivo para eventos coronarianos e acidente vascular cerebral (GAST et al., 2012; UETANI et al., 2012), principalmente por incluir em sua fórmula os níveis circulantes tanto de glicose como de insulina, mostrando uma associação mais forte com doenças cardiovasculares do

que a glicemia ou insulina isoladas (GAST et al., 2012). Observamos através do índice HOMA-RI, que os animais sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram resistência à insulina semelhante ao estudo de Bai, et al. 2015 e o treinamento físico aeróbio normalizou estes valores. Outros estudos também demonstraram importante papel do exercício físico na homeostase da glicose e sensibilidade à insulina, em ratos (STANISIC et al. 2016) e em humanos (HÁ, et al. 2015). Além de indicar que o exercício físico aumenta a fosforilação de substrato de receptor de insulina-1 (IRS-1), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase B (AKT ou PKB), demonstrando um efeito positivo sobre a via de sinalização de insulina (Liu et al., 2015).

O tecido adiposo branco possui importante função endócrina, é responsável pela produção e liberação de grande variedade de substâncias tais como adipocinas pró-inflamatórias (leptina, resistina, vaspina, quemerina e visfatina), adipocinas anti-inflamatória (adiponectina, omentina e adrenomodulina), citocinas (interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), TNF- α), a proteína quimiotática de monócitos (MCP1) e o inibidor do ativador de plasminogênio (PAI1), mantendo intensa comunicação com os demais órgãos e sistemas orgânicos. As adipocinas estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos, entre eles o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, sensibilidade à insulina, a angiogênese, proteção vascular, regulação da pressão arterial, coagulação sanguínea e resposta inflamatória (HAUNER, 2004; RAJSHEKER et al., 2010).

A leptina interage com diferentes sistemas neuroendócrinos centrais, envolvidos no controle da ingestão de alimentos, regulação do apetite e gasto energético (CARO et al., 1996; MONTAGUE et al., 1997; GUIMARAES et al., 2007). Casos de obesidade podem resultar de uma alteração no transporte da leptina ao sistema nervoso central (CARO et al., 1996) ou também alteração pós-receptor, levando a uma falha na ativação dos mediadores neuroendócrinos reguladores do peso corporal, caracterizando um quadro com elevados níveis circulantes de leptina e resistência a leptina (KALRA et al., 2001).

Em nosso estudo os animais obesos apresentaram aumento do tecido adiposo epididimal e PVAT na aorta torácica, acompanhado por aumento nos valores circulantes de leptina. Evidências demonstraram correlação positiva dos altos níveis de leptina com maior acúmulo de tecido adiposo, principalmente do tecido adiposo branco, em modelos de obesidade em roedores (YASARI et al., 2009;

AILHAUD 2006; GAUTHIER et al., 2004; PELLIZZON et al., 2002; KOWALSKA et al., 1999) bem como, em humanos (BELTOWSKI 2006; PORRECA et al., 2004; GUZIK et al., 2003).

Este dado nos auxilia no entendimento dos resultados envolvendo o treinamento físico, pois não observamos redução nos valores circulantes de leptina, bem como redução de peso corporal, gordura epididimal e PVAT nos animais treinados e alimentados com dieta hiperlipídica. É importante salientar que outros estudos com diferentes protocolos de obesidade em roedores, reportaram redução na concentração plasmática de leptina promovida por diferentes protocolos de treinamento físico aeróbio (BRADLEY et al., 2008), bem como na redução da expressão de RNAm para leptina no tecido adiposo branco (ZACHWIEJA et al., 1997; GOLLISCH et al., 2009; VIEIRA et al., 2009), porém todos eles também evidenciaram redução do peso corporal e/ou gordura corporal.

Por sua vez, a resistina está envolvida em processos inflamatórios crônicos associados à obesidade (GOMEZ-AMBROSI; FRUHBECK, 2001). Apesar de em modelos animais mostrarem possível envolvimento da resistina na resistência à insulina, os estudos ainda são controversos (JANKE et al., 2002; OUCHI et al., 2011). Assim como demonstrado em estudo prévio (RAJALA et al., 2004), observamos aumento dos valores de resistina circulante em camundongos obesos, porém também foi evidenciado em camundongos obesos db/db redução dos valores de RNAm para resistina no tecido adiposo epididimal (HONGYING et al., 2013).

Estudos com o objetivo de investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio na concentração de resistina ainda são escassos e controversos. Recente estudo desenvolvido com crianças obesas demonstrou importante redução promovida pelo exercício físico aeróbio nos valores circulantes de resistina, associado com redução do peso corporal (LEE; KANG, 2015). Por outro lado, também foi demonstrado aumento nos valores circulantes de resistina em crianças obesas envolvidas em um programa de exercício físico e controle alimentar (BLUER et al., 2014). Em nosso estudo, o treinamento físico não reduziu os valores circulantes de resistina em camundongos obesos.

Por sua vez, o TNF- α é considerado uma adipocina pró-inflamatória, apresenta grande diversidade em sua atividade biológica, incluindo resposta imunológica, reações inflamatórias e neovascularização. Em condições fisiológicas, o tecido adiposo produz TNF- α , porém apenas uma parte do TNF- α derivado do

tecido adiposo se origina do próprio adipócito, uma considerável parte pode ser secretada por macrófagos infiltrados no tecido, fato este particularmente importante na obesidade (WEISBERG et al., 2003; PRADO et al., 2009).

Foi demonstrado em humanos (BOSCHMANN et al., 2005; FLEISCHMANN et al., 2005; VIRTANEN et al., 2002) e em roedores (CINTI et al., 2005; RAUSCH et al., 2008; WEISBERG et al., 2003; YE et al., 2007) que a hipertrofia do tecido adiposo sem adequado suporte vascular pode levar a hipóxia e morte celular com consequente infiltração de macrófagos e inflamação (PASARICA et al., 2009; TRAYHURN et al., 2008), sendo que a taxa de infiltração de macrófagos é muito maior em tecido adiposo visceral do que no tecido adiposo subcutâneo (CANCELLO; CLÉMENT, 2006).

Em nosso estudo notamos um aumento nos valores circulantes de TNF- α nos camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica, e o treinamento físico aeróbio foi eficaz em reduzir esses valores, mesmo não reduzindo a massa de tecido adiposo epididimal e tecido adiposo perivascular. Foi demonstrado que o exercício físico aeróbio estimula a angiogênese no tecido adiposo, com melhora no fluxo sanguíneo, podendo reduzir a hipóxia e a infiltração de macrófagos (YOU et al., 2013), o que fundamenta a redução do TNF- α circulante nos camundongos obesos e treinados observada neste estudo.

A concentração de adiponectina está inversamente correlacionada com o acúmulo de gordura visceral (MEDINA-BRAVO et al., 2011), sendo sua concentração reduzida na obesidade (OUCHI et al., 1999; SPRANGER et al., 2003). A adiponectina parece proteger o endotélio vascular contra a maioria dos processos envolvidos na etiopatogenia da aterosclerose, com capacidade de inibir a adesão de monócitos no endotélio vascular, a expressão de moléculas de adesão, bem como a transformação de macrófagos em células de espuma (foam cells) (GOLDSTEIN; SCALIA 2004; FANTUZZI et al., 2005). Recente estudo verificou aumento nos valores plasmáticos de adiponectina em pacientes obesos submetidos a restrição calórica após a redução do peso corporal e da gordura visceral (ROLLAND et al., 2011).

No presente estudo não observamos alteração nos valores circulantes de adiponectina total e adiponectina de alto peso molecular. Alguns estudos envolvendo treinamento físico demonstraram, em humanos, aumento na expressão de adiponectina no tecido adiposo subcutâneo (GREEN et al., 2004) e nas

concentrações plasmáticas (LABROPOULOS et al., 1998; WALTHER et al., 2004) e em ratos, aumento na expressão de adiponectina no tecido adiposo visceral e subcutâneo (NIEBAUER; COOKE, 1996).

No entanto, outros autores não encontraram diferença, tanto na expressão de adiponectina no tecido adiposo visceral de humanos (GREEN et al., 2004; MIYACHI et al., 2001; TAO et al., 2007; WALTHER et al., 2004) e roedores (KINGWELL et al., 1997), quanto na concentração plasmática em resposta ao treinamento físico (DARLEY-USMAR; STARKE-REED, 2000; FRANZONI et al., 2004; RUDIC et al., 1998). Assim, futuros estudos são necessários para investigar os efeitos do treinamento físico aeróbio na expressão e liberação de adiponectina.

Avaliamos também, de forma indireta, o estresse oxidativo através da medida de malondialdeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica. Observamos aumento nos níveis de MDA nos camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica, dados encontrados por outros autores (OZATA et al. 2002; FARIAS et al. 2013). Sabe-se que indivíduos obesos apresentam marcadores de estresse oxidativo, incluindo elevada concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KEANEY, 2003). Esta alteração não foi observada no grupo treinado e alimentado com dieta hiperlipídica, demonstrando assim o importante papel do treinamento físico aeróbio em induzir uma diminuição do dano oxidativo e dos marcadores de peroxidação lipídica. Estes resultados corroboram com estudos anteriores em humanos (BOTEZELLI et al. 2011; FARINHA et al. 2015) e também em animais (FARIAS et al. 2013).

8.2 ALTERAÇÕES NA FUNÇÃO VASCULAR DA AORTA TORÁCICA

Relacionado à função vascular, como já citado, o PVAT possui características especiais, está localizado ao redor dos vasos sanguíneos e pode influenciar diretamente a função vascular (GAO et al., 2007). Em particular, o PVAT encontrado ao redor da aorta torácica apresenta células do tecido adiposo branco e marrom, porém com características funcionais significativas de tecido adiposo marrom, com células multiloculares, significativa expressão de RNAm para PPAR- γ , UCP-1, bem como expressão proteica do fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA) (FITZGIBBONS et al., 2011; SZASZ; WEBB, 2012). Foi comprovado que em ratos

alimentados com dieta hiperlipídica a massa total do PVAT da aorta está alterada (MA et al., 2010).

O PVAT se expande proporcionalmente a gordura visceral de indivíduos obesos, e novas evidências demonstram que o PVAT pode desencadear respostas específicas e independentes de outros depósitos de gordura, levando a uma disfunção vascular e finalmente a uma doença cardiovascular (FITZGIBBONS; CZECH, 2014). Em nosso estudo, também observamos aumento significativo da massa do PVAT em aorta torácica, acompanhado por significativa redução no relaxamento dependente de endotélio, comprometendo a função vascular nos animais sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica.

Historicamente, o primeiro estudo que investigou o papel do PVAT na reatividade vascular de aorta torácica de ratos, demonstrou redução da contração induzida pela norepinefrina, porém sem alterações ao cloreto de potássio e fenilefrina (SOLTIS; CASSIS 1991). Posteriormente, estudos também realizados em aorta torácica de ratos demonstraram redução da contração a serotonina (GAO et al., 2007; DUBROVSKA et al., 2004; ARAUJO et al., 2015), angiotensina II e fenilefrina (LOHN et al., 2002; ARAUJO et al., 2015). Outros trabalhos foram desenvolvidos em artéria mesentérica de camundongos e também demonstraram redução da contração a norepinefrina (LYNCH et al., 2013; WITHERS et al., 2013), serotonina, fenilefrina, porém sem alterações ao U46619 (VERLOHREN et al., 2004). Também não foi observada alteração na resposta contrátil à ET-1 em artéria mesentérica de ratos obesos (MARCHESI, et al. 2009). Em nosso estudo, não observamos efeito anticontrátil do PVAT para os agentes U46619 e ET-1 nos animais dos grupos controle sedentário e controle treinado.

Em especial, diferentes modelos de indução de obesidade em animais com severa disfunção metabólica bem como exacerbado aumento do PVAT, demonstraram perda do efeito anticontrátil promovido pelo PVAT (GIL-ORTEGA et al., 2009; MA et al., 2010; PAYNE et al., 2010). No entanto, estudos que avaliaram indução de obesidade em quadros com disfunção metabólica moderada observaram aumento da produção de NO pelo PVAT e melhora na função vascular como um mecanismo compensatório do estágio inicial da obesidade (GIL-ORTEGA et al., 2010; FERNÁNDEZ-ALFONSO et al., 2013). Também não encontramos alterações na resposta anticontrátil induzida pelo PVAT nos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

Mais recentemente, foi observada redução do relaxamento dependente de endotélio em artéria mesentérica de ratos com síndrome metabólica na presença de PVAT (MENDIZÁBAL et al., 2013). Por outro lado, outros estudos não evidenciaram redução do relaxamento na presença de PVAT, sendo realizados em aorta torácica de camundongos e também artéria coronária de suínos (REIFENBERGER et al., 2007; BUNKER et al., 2010; KETONEN et al., 2010). Sugere-se que os quadros de obesidade possam ser divididos em duas categorias, aqueles que apresentam controle metabólico ligeiramente disfuncional e aqueles que apresentam controle metabólico completamente disfuncional. É interessante salientar, que a segunda categoria de fenótipo metabólico possui níveis elevados de marcadores pró-inflamatórios, bem como maior risco de comprometimento cardiovascular quando comparados a primeira categoria (APOVIAN et al., 2008; OUCHI et al., 2011).

O principal resultado relacionado a reatividade vascular evidenciado em nosso estudo indica que a presença do PVAT pode alterar o relaxamento dependente de endotélio em aorta torácica de camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica por dezesseis semanas. Alguns estudos realizados em animais alimentados com dieta hiperlipídica também demonstram uma redução na resposta relaxante dependente do endotélio em aorta, artéria renal e arteríolas (COSTA et al., 2011; DENG et al., 2010; DIWAN et al., 2011; ERDEI et al. 2006, VAN DRONGELEN et al., 2012).

Esse resultado comprova a participação do PVAT na modulação da função vascular, pois funcionalmente somente os animais sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram redução na resposta a ACh e redução na produção de NO vascular. Vimos também um significativo aumento na expressão da iNOS no PVAT. Por outro lado, os animais do grupo treinado, não apresentaram tais alterações vasculares e o treinamento físico aeróbio foi eficaz em reduzir a expressão de iNOS no PVAT. Até o momento, poucos estudos avaliaram o papel do PVAT associado aos efeitos do treinamento físico e da dieta hiperlipídica, sendo desenvolvidos unicamente em artéria coronária circunflexa esquerda de porcos (REIFENBERGER et al., 2007; BUNKER; LAUGHLIN, 2010).

Na função vascular, sabe-se que o estímulo mecânico, promovido pela força de cisalhamento em resposta ao exercício físico, é um importante mediador das adaptações vasculares e desempenha papel fundamental na prevenção de

disfunção endotelial e das doenças cardiovasculares (LAUGHLIN et al., 2008). Estudos realizados em cultura de células endoteliais sugerem que o aumento da frequência da força de cisalhamento pelo exercício físico, favorece o reparo ao dano de células endoteliais disfuncionais, pelo aumento da proliferação e angiogênese (ZHANG; FRIEDMAN, 2013) e ao mesmo tempo, o aumento da magnitude na força de cisalhamento suprime a inflamação e estresse oxidativo (ZHANG; FRIEDMAN, 2013). Neste estudo sentido, a força de cisalhamento (shear stress) promovida pelo aumento do fluxo sanguíneo, é um importante estímulo para ativação eNOS presentes nas células endoteliais e consequentemente produção de NO (BUSCONI; MICHEL, 1993). De fato, o treinamento físico aeróbio foi eficaz em normalizar a produção de NO em aorta de camundongos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica, acompanhado por aumento na expressão de eNOS na aorta desses animais.

Por fim, a iNOS foi originalmente identificada em macrófagos e sua atividade e expressão estão relacionadas com o sistema imune e aumento do estado inflamatório celular (MACMICKING et al., 1995; MCNEILL et al., 2014). A literatura tem demonstrado em modelos animais a associação entre obesidade, aumento da expressão da iNOS no tecido adiposo (BOULOUMIÉ et al., 2005; LYON et al. 2003; YOO; CHOI, 2014; PERREAULT; MARETTE, 2001). Acreditamos que o possível NO produzido pelo aumento da expressão proteica de iNOS no PVAT dos camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica não esteja agindo no leito vascular como vasodilatador, mas sim contribuindo para o estresse oxidativo.

Estudos evidenciaram que o exercício físico diminui os níveis TNF- α , IL-6 e IL-1 β , tanto em animais quanto em humanos (GOLLASCH et al., 2004; VIEIRA et al., 2009; SAKURAI et al., 2009), diminuindo o estado inflamatório e possivelmente reduzindo fatores de transcrição envolvidos na expressão da iNOS no PVAT. Interessantemente, assim como reduzida expressão da iNOS no PVAT, também observamos redução nos valores circulantes de TNF- α nos animais treinados e alimentados com dieta hiperlipídica.

9 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a presença do PVAT reduziu o relaxamento dependente de endotélio em aorta torácica de camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica, associado com redução na produção de NO vascular e aumento na expressão de iNOS no PVAT, bem como, com significativas alterações metabólicas e pró-inflamatórias circulantes.

O treinamento físico aeróbio de moderada intensidade normalizou a função vascular, sendo esta resposta relacionada com aumento da expressão de eNOS e produção de NO na aorta torácia e com redução na expressão da iNOS no PVAT e dos valores circulantes de TNF- α em animais treinados e alimentados com dieta hiperlipídica.

10 REFERÊNCIAS

- ACHIKE, F. I.; TO, N. H.; WANG, H.; KWAN, C. Y. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, 2011.
- AGHAMOHAMMADZADEH, R.; WITHERS, S.; LYNCH, F. et al. Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target. **Br J Pharmacol**. 165:670-682, 2012.
- AILHAUD, G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. **Comptes Rendus Biologies**. 2006;329:570–577.
- AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Basic mechanisms controlling cytosolic Ca^{2+} concentration and the Ca^{2+} - dependent regulation of vascular tone. **Ca²⁺**. 21(2): p. 220-31, 2007.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. **Biochem J**. 1; 357(Pt 3): 593-615, 2001.
- APOVIAN, C.M.; BIGORNIA, S.; MOTT, M. et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2008 Sep;28(9):1654-9.
- ARAUJO, H.N.; SILVA, C.P.V.da; SPONTON, A.C.S. et al. Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. **Life Sciences**. 125: 79–87, 2015.
- BELTOWSKI, J. Leptin and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. v. 189. 47-60. 2006.
- BELTOWSKI, J.; GURANOWSKI, A.; JAMROZ-WIS, A. et al. Hydrogen-sulfide-mediated vasodilatory effect of nucleoside 5'-monophosphorothioates in perivascular adipose tissue. **Can. J. Physiol. Pharmacol**. 93: 585–595, 2015.
- BENDALL, J.K.; ALP, N.J.; WARRICK, N. et al. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. **Circ Res**. 28;97(9):864-71, 2005.
- BERG, A.H.; SCHERER, P.E. Adipose Tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res**. 2005 May 13;96(9):939-49.
- BLUHER, M. Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. 2009 Jun;117(6):241-50.
- BLUER, S. et al. Effects of a 1-Year Exercise and Lifestyle Intervention on Irisin, Adipokines, and Inflammatory Markers in obese children. **Obesity journal**. v. 22. n. 7. 2014.

BORG, M.L.; OMRAN, S.F. Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. **The Journal of Physiology**. 2012. Volume 590, Issue 17, pages 4377–4389.

BOSCHMANN, M.; ENGELI, S.; ADAMS, F. et al. Adipose tissue metabolism and CD11b expression on monocytes in obese hypertensives. **Hypertension**. 2005. 46(1):130-6.

BOULOUMIE, A.; MARUMO, T.; LAFONTAN, M.; BUSSE, R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. **FASEB J**. 1999;13:1231–8.

BOTEZELLI, J. D.; CAMBRI, L. T.; GHEZZI, A. C. et al. Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**. 3:35, 2011.

BRADLEY, R. L.; JEON, J.Y.; LIU, F.F. et al. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 295 (3): E586-94, 2008.

BROOKS, G.A.; WHITE, P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.45, n.6, p.1009-15, 1978.

BUNKER, A.K.; LAUGHLIN, M.H. Influence of exercise and perivascular adipose tissue on coronary artery vasomotor function in a familial hypercholesterolemic porcine atherosclerosis model. **J Appl Physiol**. 108: 490–497, 2010.

BUSCONI, L. e MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. **J Biol Chem**. 268(12). 1993.

CALIXTO, M.C.; LINTOMEN, L.; SCHENKA, A. et al. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **Br J Pharmacol**, 59:617-625, 2010.

CANCELLO, R, CLÉMENT, K. et al. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. 2006. **BJOG**. Out;113(10):1141-7.

CAO, H. Adipocytokines in obesity and metabolic disease. **J Endocrinol**. 220: T47–T59, 2014.

CARO, J.F.; KOLACZYNSKI, J.W.; NYCE, M.R. et al. Decreased cerebrospinal fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **Lancet**. 1996;348(9021):159-61.

CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B.; TOSTES, R.C. et al. Funções normais do endotélio- Uma visão geral. In LUIZ, P.L.; LAURINDO, F.R.M. CHAGAS, A.C.P. **Endotélio e Doenças cardiovasculares**. São Paulo: Atheneu, 2003. P 17-32.

CHANG, L.; VILLACORTA, L.; RONGXIA, L. et al. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- γ deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. **Circulation**. 2012 Aug 28;126(9):1067-78.

CHEN, C.; JIANG, J.; LU, J.M. et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology**, 2010.

CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**. 2005 Nov;46(11):2347-55.

CINTRA, D.E.; PAULI, J.R.; ARAÚJO, E.P. et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **J Hepatol**. 2008 Apr; 48(4):628-37.

CIOLAC, E.G.; GUIMARÃES, G.V. Resistance Training in Type 2 Diabetic Patients Improves Uric Acid levels. **Rev Bras Med Esporte**, 10:319-324, 2004.

COLAÇO, L.A.; PASSAGLIA, R.T.A.; FORTES, Z.B. et al. Biologia Vascular e endotélio. In: KRIEGER, J.E. Bases moleculares das doenças cardiovasculares. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. P331-386.

COSTA, R.R.S.; VILLELA, N.R.; SOUZA, M. das G.; BOA, B. C. S. et al. High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. **Microvascular Research**. 82. 416–422. 2011.

DARLEY-USMAR, V.; STARKE-REED, P.E. Antioxidants: strategies for interventions in aging and age-related diseases. Workshop sponsored by the National Institute on Aging and by the Office of Dietary Supplements. **Antioxid Redox Signal**. 2000; 2 (3): 375-7.

DASHWOOD, M.R.; DOOLEY, A.; SHI-WEN, X. et al. Does periadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery? **J Vasc Res**. 2007;44:175–181.

DAVIS, M.E; CAI, H. MCCANN, L. et al. Role of c-Src in Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. During exercise training. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**. 284: H1449-H1453, 2003.

DEANFIELD, J.E. HALCOX, J.P. RABELINK, T.J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**. 13; 115 (10): 1285-95, 2007.

DELBIN, M.A.; DAVEL, A.P.; COUTO, G.K., et al. Interaction between Advanced Glycation End Products Formation and Vascular Responses in Femoral and Coronary Arteries from Exercised Diabetic Rats. **PLoS One**, 7: e53318, 2012.

DENG, G.; LONG, Y.; RYU, Y. te al. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK–eNOS Pathway. **Nature**. (34): 165–171, 2010.

DIWAN V.; POUDYAL, H.; BROWN, L. Piperine attenuates cardiovascular, liver and metabolic changes in high carbohydrate, high fat-fed rats. **Cell Biochem Biophys.** 67(5):790-2, 2004.

DIWAN, V.; POUDYAL, H.; BROWN, L. Role of T Regulatory Lymphocytes in the Pathogenesis of High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome. **Cell Biochem Biophys**, 30, 2011.

DONATO, A.J.; HENSON, G.D.; MORGAN, R.G. et al. TNF- α impairs endothelial function in adipose tissue resistance arteries of mice with diet-induced obesity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 15; 303 (6): H672-9, 2012.

DUBROVSKA, G.; VERLOHREN, S.; LUFT, F.C. et al. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 286: H1107–H1113, 2004.

DURRANT, J.R.; SEALS, D.R.; CONNELL, M.L. et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and downregulation of NADPH oxidase, **J Physiol.** 587:3271-3285, 2009.

ECKEL, R.H. et al. Prevention Conference VII: Obesity, a Worldwide Epidemic Related to Heart Disease and Stroke: Executive Summary. **Circulation**, 2004.

ENNEZAT, P.V.; MALENDOWICZ, S.L.; TESTA, M. et al. Physical training in patients with chronic heart failure enhances the expression of genes encoding antioxidative enzymes. **J Am Coll Cardiol.** 2001;38:194–8.

ERDEI, N. et al. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2006.

FANG, L.; ZHAO, J.; CHEN, Y. et al. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. **J. Hypertens.** 27(11): 2174–2185, 2009.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol.** 2005;115(5):911-9. Review.

FARIAS, J. M. de; BOM, K. F.; TROMM, C. B. et al. Effect of Physical Training on the Adipose Tissue of Diet-induced Obesity Mice: Interaction Between Reactive Oxygen Species and Lipolysis. **Horm Metab Res.** 45: 190–196, 2013.

FARINHA, J. B.; STECKLING, F. M.; STEFANELLO, S. T. et al. Response of oxidative stress and inflammatory biomarkers to a 12-week aerobic exercise training in women with metabolic syndrome. **Sports Medicine – Open.** 1 (3):2-10. 2015.

FERREIRA, J.C.B. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 760-765. 2007.

FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S.; GIL-ORTEGA, M.; GARCÍA-PRIETO, C.F. et al. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **Int J Endocrinol**. 2013.

FISHER, A.B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A.I. et al. Endothelial cellular response to altered shear stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 281:L529-L533, 2001.

FITZGIBBONS, T.P.; CZECH, M.P. Epicardial and Perivascular Adipose Tissues and Their Influence on Cardiovascular Disease: Basic Mechanisms and Clinical Associations. **J Am Heart Assoc**. 3:e000582, 2014.

FLEISCHMANN, E.; KURZ, A.; NIEDERMAYR, M. et al. Tissue Oxygenation in Obese and Non-obese Patients During Laparoscopy. **Obes Surg**. 2005; 15(6): 813–819.

FORNONI, A.; RAIJ, L. Metabolic syndrome and endothelial dysfunction. **Curr Hypertens Rep**. 7(2): 88-95, 2005.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthase: regulation and function. **Eur Heart J**. 33(7): p.829-37, 2011.

FRANZONI, F.; GALETTA, F.; MORIZO, C. et al. Effects of age and physical fitness on microcirculatory function. **Clin Sci Lond**. 2004; 106(3): 329-35.

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

GAO, Y.J. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. **Curr. Pharm. Des**. 13, 2185–2192. 2007.

GAO, Y.J.; LU, C.; SU, L.Y. et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **British Journal of Pharmacology**. 151,323–331, 2007.

GAST, K.B.; TJEERDEMA, N.; STIJNEN, T. SMIT, J.W.; DEKKERS, O.M. Insulin resistance and risk of incident cardiovascular events in adults without diabetes: meta-analysis. *PloS One*. 2012.

GARCIA-VALLES, R.; GOMEZ-CABRERA, M.C. et al. Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but improves health span in mice. **Longev Healthspan**. 2: 14. 2013.

GAUTHIER; M. S.; COUTURIER, K.; CHARBONNEAU, A. et al. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regime non hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. **Int J Obes Relat Metab Disord**. 28(8):1064-71, 2004.

GIELEN, S.; SCHULER, G.; ADAMS, V. Cardiovascular Effects of Exercise Training Molecular Mechanisms. **Circulation**, 2010.

GIL-ORTEGA, M.; STUCCHI, P.; GUZMAN-RUIZ, R. et al. Adaptive nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. **Endocrinology**. 2010;151:3299–3306.

GOLDSTEIN, B.J.; SCALIA, R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **J Clin Endocrinol Metab**. 2004;89(6):2563-8.

GOLLASCH, M.; DUBROVSKA, G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. **Trends Pharmacol Sci**. 2004;25:647–653.

GOLLISCH, K.S.C.; BRANDAUER, J.; JESSEN, N. et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2009. 297(2): E495–E504.

GOMEZ-AMBROSI, J.; FRUHBECK, G. Do resistin and resistin-like molecules also link obesity to inflammatory diseases? **Ann Intern Med**. 2001; 135(4): 306-307.

GREEN, D.J.; MAIORANNA, A.; O'DRISCOLL, G. et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans, **J Physiol**. 15; 561 (Pt 1): 1-25, 2004.

GUIMARAES, D.E.D.; SARDINHA, F.L.C.; MIZURINI, D.M. et al. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo Adipokines: a new view of adipose tissue. **Rev. Nutr**. 2007. Campinas, 20(5):549-559.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Excitação e contração do músculo Liso, In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p. 95-103.

GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol**. 2003;54(4):469–487.

HA, C.H.; SWEARINGIN, B.; JEON, Y. K. Relationship of visfatin level to pancreatic endocrine hormone level, HOMA-IR index, and HOMA β -cell index in overweight women who performed hydraulic resistance exercise. **J Phys Ther Sci**. Vol. 27, No. 9, 2015.

HAJER, G.R.; VAN HAEFTEN, T.W.; VISSEREN, F.L. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **Eur Heart J**. 29:2959–2971, 2008.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiol Behav**. 2004; 83(4):653-8.

HONGYING, Y.; HERBERT, J.Z.; XU, A.; HOO, R.L.C. Resistin Production from Adipose Tissue Is Decreased in db/db Obese Mice, and Is Reversed by Rosiglitazone. **PLoS One**. 2013; 8(6): e65543.

IGNARRO, L.I.; BYRNS, R.E.; BUGA, B.M. et al. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. Vol. 244, n. 1, 1987.

JANKE, J.; ENGELI, S.; GORZELNIAK, K.; SHARMA, A. M. Extraction of total RNA from adipocytes. **Horm Metab Res**. 2001. 33: 213–215.

JENDZJOWSKY, N.G.; DELOREY, D.S. Short-term exercise training enhances functional sympatholysis through a nitric oxide-dependent mechanism. **J Physiol**. 15; 591: 1535-49, 2013.

JUDGE, S.; JANG, Y.M.; SMITH, A. et al. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. **Am. J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. R1564-R1572. 2005.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**. 2005;116:1784–1792.

KALRA, S.P. Circumventing leptin resistance for weight control. **PNAS**. 98 (8): 4279-4281, 2001.

KAWANISHI, N.; KATO, K.; TAKAHASHI, M. et al. Curcumin attenuates oxidative stress following downhill running-induced muscle damage. **Biochem Biophys Res Commun**. 2013. 22;441(3):573-8.

KEANEY, J.F. et al. Obesity and systemic oxidative stress clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 23:434–9. 2003.

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

KINGWELL, B.A.; SHERRARD, B.; JENNINGS, G.L.; DART, A.M. Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. **Am J Physiol**. 1997 Mar;272(3 Pt 2): H1070–H1077.

KNUTSON, B.; TAYLOR, J.; KAUFMAN, M. et al. Distributed Neural Representation of Expected Value. **The Journal of Neuroscience**. 2005. 25(19):4806 – 4812.

KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; KAWAHARA, S.; KIRINO, Y.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; NAGANO, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**. 70, 2446–2453. 1998.

KORDA, M.; KUBANT, R.; PATTON, S. et al. Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology Published**. 2008. 295 (4): H1514-H1521.

KOWALSKA, I.; STRACZKOWSKI, M.; GORSKI, J.; KINALSKA, I. The effect of fasting and physical exercise on plasma leptin concentrations in high-fat fed rats. **J Physiol Pharmacol**. 1999;50:309–320.

LABROPOULOS, N.; ZARGE, J.; MANSOUR, M. et al. Compensatory Arterial Enlargement Is a Common Pathobiologic Response in Early Atherosclerosis. **Am J Surg**. 176 (2): 140-3, 1998.

LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Prog Lipid Res**. 2009. 48(5):275-97.

LAUGHLIN, M.H.; NEWCOMER, S.C.; BENDER, S.B. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. **J Appl Physiol** 104: 588–600, 2008.

LEE, S.S.; KANG, S. Effects of regular exercise on obesity and type 2 diabetes mellitus in Korean children: improvements glycemic control and serum adipokines level. **J Phys Ther Sci**. 2015 Jun;27(6):1903-7.

LESNIEWSKI, L.A.; DURRANT, J.R.; CONNELL, M.L. et al. Aerobic exercise reverses arterial inflammation with aging in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 301: H1025–H1032, 2011.

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

LI, M.R.; YU, Y.R.; DENG, G. Astragalus membranaceus improve endothelial-dependent vasodilatator function in obese rats. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao**. 30 (1): 7-10, 2010.

LI, R., WANG, W.Q.; ZHANG, H. et al. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 293: E1703-1708, 2007.

LI, Y. et al. Specific subtypes of nicotinic cholinergic receptors involved in sympathetic and parasympathetic cardiovascular responses. **Neuroscience Letters**. Volume 462, Issue 1, 18, Pages 20-23, 2009.

LIU, Z.; PATIL, I.Y.; JIANG, T. et al. High-fat diet Induces hepatic insulin resistance and impairment of synaptic Plasticity. **PlosOne**. 2015.

LJUBICIC, V.; JOSEPH, A.M.; SALEEM, A. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. **Biochim Biophys Acta**. 2010 Mar;1800(3):223-34.

LOHN, M.; DUBROVSKA, G.; LAUTERBACH, B. et al. Hydrogen Sulfide: Potent Regulator of Vascular Tone and Stimulator of Angiogenesis. **FASEB**, 16:1057-1063, 2012.

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

LYNCH, F.M.; WITHERS, S.B.; YAO, Z. et al. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2013 Mar 15;304(6):H786-95.

LYON, C.J.; LAW, R.E.; HSUEH, W.A. Minireview: Adiposity, Inflammation, and Atherogenesis. **Endocrinology.** 144(6):2195–2200. 2003.

MA, L.; MA, S.; HE, H. et al. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/m TOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Hypertens Res.** 2010;33(5):446–453.

MACMICKING, J.D.; NATHAN, C.; HOM, G. et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell.** 1995.19;81(4):641-50.

MALINOWSKI, M., DEJA, M.A.; GOLBA, K.S. et al. Perivascular tissue of internal thoracic artery releases potent nitric oxide and prostacyclin-independent anticontractile factor. **Eur J Cardiothorac Surg.** 2008. Feb;33(2):225-31.

MARCHESI, C.; EBRAHIMIAN, T; ÂNGULO, O. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Perivascular Adipose Oxidative Stress and Inflammation Contribute to Vascular Dysfunction in a Rodent Model of Metabolic Syndrome. **Hypertension.** 54:1384-1392, 2009.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and in-sulin concentrations in man. **Diabetologia.** 28:412-9. 1985.

MCADLE, W.; KATCH, F.; KATCH, V. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.695.

MCNEILL, E. et al. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. **Free Radic Biol Med.** 2014;79C:206–216.

MEDEIROS, N. da S.; ABREU, F. G. de; COLATO, A. S. et al. Effects of Concurrent Training on Oxidative Stress and Insulin Resistance in Obese Individuals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity.** 697181, 1-6. 2015.

MEDINA-BRAVO, P.; MEZA-SANTIBANEZ, R.; ROSAS-FERNANDEZ, P. et al. Decrease in serum adiponectin levels associated with visceral fat accumulation

independent of pubertal stage in children and adolescents. **Arch Med Res.** 2011;42(2):115–21.

MENDIZÁBAL, Y.; LLORENS, S.; NAVA, E. Vasoactive effects of prostaglandins from the perivascular fat of mesenteric resistance arteries in WKY and SHROB rats. **Life Sci.** 2013. 18;93(25-26):1023-32.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013. Após oito anos em ascensão, obesidade no Brasil para de crescer. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/12457-apos-oito-anos-em-ascensao-obesidade-no-brasil-para-de-crescer>. Acesso em: 08 jan 2016.

MOHAMED, F.; MONGE, J.C.; GORDON, A. et al. Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor-alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 15(1):52-7, 1995.

MOHAMMED, M.M.; MYERS, D.S.; SOFOLA, O.A. et al. Vasodilator effects of leptin on canine isolated mesenteric arteries and veins. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2007;34(8):771–774.

MONTAGUE, C.T. FAROOQI, I.S.; WHITEHEAD, J.P. et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature.** 1997. 26;387(6636):903-8.

MONTEIRO, D. et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in obese children and adolescents: markers and effect of lifestyle intervention. **Obesity Reviews.** Mai, 2012.

MORAES, C. de; DAVEL, A. P.; ROSSONI, L.V. et al. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiol.** 29:8-12, 2008.

NAKAGAWA, K.; HIGASHI, Y.; SASAKI, S. et al. Leptin causes vasodilation in humans. **Hypertens Res.** 2002 Mar;25(2):161-5.

NIEBAUER, J.; COOKE, J.P. Cardiovascular Effects of Exercise: Role of Endothelial Shear Stress. **J. Am Coll Cardiol.** 28 (7): 1652-60, 1996.

OGUT, O.; BROZOVICH, F.V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **J Mol Cell Cardiol.** 35(4): p. 347-55, 2003.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Obesity and overweight. Fact sheet <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, 2015.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation.** 1999;100(25):2473-6.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**. 2011.11(2):85-97.

OZATA, M.; MERGEN, M. OKTENLI, C. et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. **Clinical Biochemistry**. (35): 627– 631, 2002.

PASARICA, M.; GOWRONSKA-KOZAK, B.; BURK, D. et al. Adipose tissue collagen VI in obesity. **J Clin Endocrinol Metab**. 2009. 94(12):5155-62.

PAYNE, G.A.; BORBOUSE, L.; KUMAR, S. et al. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-beta pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2010;30(9):1711–7.

PELLIZZON, M. et al. Effects of dietary fatty acids and exercise on body-weight regulation and metabolism in rats. **Obesity Research**. 2002. v. 10, no. 9, p. 947-955.

PERREAULT, M.; MARETTE, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide sythase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nat Med**. 7(10):1138-43. 2001.

PORRECA, E.; DI, F.C.; MORETTA, V. et al. Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women. **Atherosclerosis**. 2004;175:139–143.

PRADA, P.O.; ROPELLE, E.R.; MOURÃO, R.H. et al. EGFR tyrosine kinase inhibitor (PD153035) improves glucose tolerance and insulin action in high-fat diet-fed mice. **Diabetes**. 2009. 58(12).

PRADO, W.L.; LOFRANO, M.C.; OYAMA, L.M. et al. Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício. **Rev Bras Med Esporte**. 2009. Vol. 15, n. 5.

RAHMOUNI, K.; HAYNES, W.G. Endothelial effects of leptina: implications in health and diseases. **Curr Diab Rep**. 2005 Aug;5(4):260-6.

RAJALA, M.W.; QI Y.; PATEL, H.R.; TAKAHASHI, N. et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. **Diabetes**. 2004 Jul;53(7):1671-9.

RAJSHEKER, S.; MANKA, D.; BLOMKALNS, A.L. et al. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. **Curr Opin Pharmacol**. 2010;10:191–196.

RAO, X.; ZHONG, J.; XU, X. et al. Exercise Protects against Diet-Induced Insulin Resistance through Downregulation of Protein Kinase C β in Mice. **PlosOne**. 2013.

RAUSCH, M.E.; WEISBERG, S.; VARDHANA, P.; TORTORIELLO, D.V. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. **Int J Obes**. 2008;32(3):451–63.

REIFENBERGER, M.S.; TURK, J.R.; NEWCOMER, S.C. et al. Perivascular fat alters reactivity of coronary artery: effects of diet and exercise. **Med Sci Sports Exerc.** 39: 2125–2134, 2007.

ROBERTS-TOLER, C.; O'NEILL, B.T.; CYPESS, A.M. Diet-Induced Obesity Causes Insulin Resistance in Mouse Brown Adipose Tissue. **Obesity.** v.0. n.0. 2015.

ROLLAND, C.; HESSION, M.; BROOM, I. Effect of weight loss on adipokine levels in obese patients. **Diabetes Metab Syndr Obes.** 2011;4:315-23.

RUDIC, R.D.; SHESELY, E.G.; MAEDA, N. et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. **J Clin Invest.** 1998; 101:731–6.

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

SAKURAI, T.; IZAWA, T.; KIZAKI, T. et al. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009;379(2):605-9.

SAKURAI, T.; OGASAWARA, J.; KIZAKI, T. et al. The Effects of Exercise Training on Obesity-Induced Dysregulated Expression of Adipokines in White Adipose Tissue. **International Journal of Endocrinology.** 801743, 2013.

SAMAAN, M.C.; MARCINKO, K.; SIKKEMA, S. et al. Endurance interval training in obese mice reduces muscle inflammation and macrophage content independently of weight loss. 2014. **Physiol Rep.** 1; 2(5).

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A.R. de. Et al. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte.** vol.10 n.4, 2004.

SESSA, W.C.; PRITCHARD, K.; SEYEDI, N. et al. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circ Res.** Feb;74(2):349–353, 1994.

SHYY, J.Y.J.; CHIEN, S. Role of Integrins in Endothelial Mechanosensing of Shear Stress. **Circulation Research,** 2002.

SIGAL, R.J. et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. **Ann Intern Med.** 147:357–369. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA (SBEM), 2014. In: <http://www.endocrino.org.br/obesidade/>. Acesso em: 15 jan. 2015.

SOLTIS, E.E.; CASSIS, L. A. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clin. Exp. Hypertens.** A13, 277–296, 1991.

SPRANGER, J.; KROKE, A.; MOHLIG, M. et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. **Lancet**. 2003; 361(9353):226-8.

STANFIELD, C. L. **Fisiologia Humana**. In: Sistema Cardiovascular: vasos sanguíneos, fluxo sanguíneo e pressão sanguínea. 5 ed. São Paulo: Pearson. P. 459-504. 2013.

STANISIC, J.; KORICANAC, G.; CULAFIC, T.; ROMIC, S. et al. Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 97-104, 2016.

STAPLETON, P.A. et al. Obesity and vascular dysfunction. **Pathophysiology**. 15(2): p. 79-89, 2008.

SUGA, T.; KINUGAWA, S.; TAKADA, S. et al. Combination of exercise training and diet restriction normalizes limited exercise capacity and impaired skeletal muscle function in diet-induced diabetic mice. **Endocrinology**. 2014;155:68–80.

SZASZ, T.; WEBB, C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. **Clinical Science**. 122, 1–12. 2012.

THOMPSON, D.; KARPE, F.; LAFONTAN, M.; FRAYN, K. Physical activity and exercise in the regulation of human adipose tissue physiology. **Physiol Ver**. 2012; 92: 157-91.

TRAYHURN, P.; WANG, B.; WOOD, I.S. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? **Br J Nutr**. 2008 Aug;100(2):227-35.

TROMBETTA, I.C. Exercício físico e dieta hipocalórica para o Exercício físico e dieta hipocalórica para o paciente obeso: vantagens e desvantagens paciente obeso: vantagens e desvantagens paciente obeso: vantagens e desvantagens. **Rev Bras Hipertens**. 2003.vol 10(2).

TSCHÖP, M., HEIMAN, M.L. Rodent obesity models: an overview. **Exp Clin Endocrinol & Diabetes**, 109:307- 319, 2001.

TSUKUMO, D.M.; CARVALHO-FILHO, M.A.; CARVALHEIRA, J.B. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, 58:1986-1998, 2007.

UETANI, T.; AMANO, T.; HARADA, K. et al. Impacto f insulin resistance on post-procedural myocardial injury and clinical outcomes in pacientes who underwent elective coronary interventions with drugeluting stents. **JACC Cardiovasc Interv**. 2012.

VAN DRONGELEN, J.; VAN KOPPEN, A.; PERTIJS, J. Impaired vascular responses to relaxin in diet-induced overweight female rats. **J Appl Physiol**. (112): 962–969, 2012.

VANHOUTTE, P.M.; MOMBOULI, J.V. Vascular Endothelium: Vasoactive Mediators. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Vol XXXIX. n. 3. p 229-238, 1996.

VASCONCELOS, L.A.B.A.; CARVALHO, H.F. Célula Muscular Lisa. In: **Células: uma abordagem multidisciplinar**.Org: Carvalho, H.F. e COLLARES-BUZATO, C.B. São Paulo: Manole, 2005. P.68-82.

VERLOHREN, S.; DUBROVSKA, G.; TSANG, S.Y. et al. Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. **Hypertension**. 44: 271-276, 2004.

VIEIRA, V.J.; HU, L.; VALENTINE, R.J. et al. Reduction in trunk fat predicts cardiovascular exercise training-related reductions in C-reactive protein. **Brain Behav Immun**. 2009. 23:485–91.

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

VIRTANEN, K.A.; LÖNNROTH, P.; PARKKOLA, R. et al. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. **J Clin Endocrinol Metab**. 2002; 87:3902–10.

WALTHER, C.; GIELEN, S. HAMBRECHT, R. The Effect of Exercise Training on Endothelial Function in Cardiovascular Disease in Humans. **Exerc Sport Sci Rev**. 32 (4): 129-34, 2004.

WANG, Z.V.; SCHERER, P.E. Adiponectin, cardiovascular function, and hypertension. **Hypertension**. 2008 Jan;51(1):8-14.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENING, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression. And function in vascular cells. **Hypertension**. 44(4): 381-6, 2004.

WEBB, R.C. Smooth Muscle Contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. 2003. 27(4):201-206.

WEISBERG, S.P.; MCCANN, D.; DESAI, M. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**. 2003;112:1796–808.

WEST, D.B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am J Clin Nutr**, 67:505S- 512S, 1998.

WESTON, A.H.; EGNER, I.; PORTER, E.L. et al. Stimulated release of a hyperpolarising factor (ADHF) from rat mesenteric artery perivascular adipose tissue; involvement of myocyte BK channels. **Br J Pharmacol**. 2013;169:1500–1509.

WITHERS, S.B.; AGABITI-ROSEI, C.; LIVINGSTONE, D.M. et al. Macrophage activation is responsible for loss of anticontractile function in inflamed perivascular fat. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2011;31(4):908–913.

WITHERS, S.B.; SIMPSON, L.; FATTAH, S.; WERNER, M.E.; HEAGERTY, A.M. cGMP-dependent protein kinase (PKG) mediates the anticontractile capacity of perivascular adipose tissue. **Cardiovasc Res.** 2014. 1;101(1):130-7.

WOODMAN, C.R.; THOMPSON, M.A.; TURK, J.R. et al. Endurance exercise training improves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hypercholesterolemic male pigs. **J Appl Physiol.** 99(4): 1412-21. 2005.

XU, X.; YING, Z.; CAI, M. et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 300:R1115-R1125, 2011.

YASARI, S.; WANG, D.; PRUD'HOMME, D. et al. Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and -e in rats. **Mol. Cell. Biochem.** 2009. 324:13-20.

YE, J.; GAO, Z.; YIN, J.; HE, Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2007. 293(4): E1118-28.

YOO, J.H.; CHOI, K.M. Adipokines as a novel link between obesity and Atherosclerosis. **World J Diabetes.** 5(3): 357-363. 2014.

YOU, T.; ARSENIS, N.C.; DISANZO, B.L.; LAMONTE, M.J. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity: current evidence and potential mechanisms. **Sports Med.** 2013;43(4):243–56.

YUDKIN, J.S.; ERINGA, E.; STEHOUEW, D.A. “Vasocrine” signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. **The Lancet.** 2005. 21–27 May 2005, Pages 1817–1820.

ZACHWIEJA, J.J.; HENDRY, S.L.; SMITH, S.R.; HARRIS, R.B. Voluntary wheel running decreases adipose tissue mass and expression of leptin mRNA in Osborne-Mendel rats. **Diabetes.** 1997 Jul;46(7):1159-66.

ZANCHI, N.E.; BECHARA, L.R.G.; TANAKA, L. Y. et al. Moderate exercise training decreases aortic superoxide production in myocardial infarcted rats. **Eur J Appl Physiol.** 104(6):1045-52, 2008.

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

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

11 ANEXO

11.1 ANEXO A- Parecer da Comissão de Ética no uso de animais



UNICAMP



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM AORTA DE CAMUNDONGOS TREINADOS E TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA" (protocolo nº 3278-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria Andréia Delbin / Andressa Silva Sousa, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

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

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 20 de fevereiro de 2014.

Campinas, 20 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

11.2 ANEXO B- Declaração referente a direitos autorais

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Papel do tecido adiposo perivascular em aorta de camundongos treinos e tratados com dieta hiperlipídica**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de abril de 2016

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Andressa Silva Sousa**
RG n.º 15.991.207

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Maria Andréia Delbin**
RG n.º 27.697.202-8