



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

JAMAIRA APARECIDA VICTORIO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA HIPERATIVAÇÃO DOS RECEPTORES  
BETA-ADRENÉRGICOS NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR DA  
AORTA TORÁCICA DE RATOS**

CAMPINAS

2018



JAMAIRA APARECIDA VICTORIO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA HIPERATIVAÇÃO DOS RECEPTORES  
BETA-ADRENÉRGICOS NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR DA  
AORTA TORÁCICA DE RATOS**

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

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA JAMAIRA APARECIDA VICTORIO, E  
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANA PAULA  
COUTO DAVEL E COORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. LUCIANA VENTURINI ROSSONI.

Orientadora: PROFA. DRA. ANA PAULA COUTO DAVEL

Coorientadora: PROFA. DRA. LUCIANA VENTURINI ROSSONI

CAMPINAS

2018

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 141989/2014-9; FAPESP, 2014/07947-6; CAPES

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

V666e Victório, Jamaira Aparecida, 1987-  
Estudo dos efeitos da hiperativação dos receptores beta-adrenérgicos no tecido adiposo perivascular da aorta torácica de ratos / Jamaira Aparecida Victório. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Ana Paula Couto Davel.  
Coorientador: Luciana Venturini Rossoni.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Receptores adrenérgicos beta. 2. Aorta torácica. 3. Corticosterona. 4. Tecido adiposo perivascular. 5. Óxido nítrico. I. Davel, Ana Paula, 1979-. II. Rossoni, Luciana Venturini. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of the effects of beta-adrenergic receptors overactivation on perivascular adipose tissue from rat thoracic aorta

**Palavras-chave em inglês:**

Receptors, Adrenergic, Beta

Aorta, Thoracic

Corticosterone

Perivascular adipose tissue

Nitric oxide

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Ana Paula Couto Davel [Orientador]

Carlos Renato Tirapelli

Fabíola Taufic Monica Iglesias

Helena Coutinho Franco de Oliveira

Eliana Hiromi Akamine

**Data de defesa:** 12-03-2018

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 12 de março de 2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel (Presidente)

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira (Titular)

Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli (Titular)

Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine (Titular)

Profa. Dra. Fabíola Taufic Monica Iglesias (Titular)

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

*Dedico este trabalho ao meu amor Wagner, aos meus pais José Roque e Odete e minha irmã*

*Charlene, e a minha orientadora Ana Paula Davel.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que participaram de modo direto e indireto na execução deste trabalho e do meu crescimento profissional e pessoal nesses 4 anos de doutorado. Aqui fica o meu *muito obrigada!*

Agradeço a *Deus* por toda a iluminação e bênçãos na minha vida.

A minha querida orientadora *Profa. Dra. Ana Paula Davel* por ser uma educadora e orientadora exemplar e além disso, estar sempre presente. Sou muito grata a oportunidade de crescer junto de uma profissional e mulher de princípios singulares. Ana *muito obrigada* pela confiança depositada em mim e por me ajudar nessa trajetória.

A minha coorientadora *Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni* que me auxiliou sempre com ótimas indagações e com quem aprendi a ter olhares detalhistas para gráficos. Obrigada por todos questionamentos e discussões científicas.

A minha mãe *Odete* pelo amor e pelas conversas longas que afastam a distância física, pelas orações e pela confiança e principalmente por me ensinar a acreditar que tudo é possível. Te amo mãe. Ao meu pai *José Roque* por me ensinar a bondade e como aproveitar a vida. Te amo pai. A minha irmã *Charlene* pelas nossas conversas psicológicas, risadas e por sempre estar presente. Te amo sis.

Ao amor da minha vida, *Wagner*, pelo amor incondicional, pelas nossas aventuras culinárias, pelas nossas conversas, por tornar minha vida mais leve dando um sentido totalmente diferente a ela, pelo companheirismo, por ficar me ouvindo repetir por várias vezes minha apresentação e já entender tudo sobre sinalização  $\beta$ -adrenérgica. Te amo amor.

Ao meu tio *José Luiz Pirola* e meus primos *Matheus* e *Marina*, por sempre me acolherem e serem uma segunda família para mim em Campinas, dando amor, lar, ótimas conversas e risadas. Amo vocês.

Aos meus sogros *Sandra* e *Wagner* e avós de consideração vó *Tereza* e vô *José*, pelo apoio e almoços de domingo sempre muito alegres. Amo vocês.

Aos amigos de laboratório que estão comigo desde o início, *Daniele*, *Amanda*, *Andressa*, *Michel*, *Carmen*, *Nádia*, *Milene*, *Marta (espanhola)*, *Nathalia*, *Natali*, *Carlos* e *Hygor*, obrigada pela amizade e companheirismo no trabalho, vocês tornaram essa trajetória mais

divertida, cheia de discussões científicas e sobre a vida, vocês realmente fizeram a diferença. Aos amigos de laboratório mais novos e recém chegamos *Aline, Olívia, Karla e Karen*.

Aos amigos de longa data *Naná, Aline Maia e Carol*. Obrigada pela amizade incondicional.

A todos amigos de corredor que encontro todos os dias e que rendem sempre muitas risadas, discussões, incentivos, aprendizados e boas trocas de materiais de laboratório.

A *Profa. Dra. Tamar Aprahamian* da Universidade de Boston por me receber em seu laboratório e me ensinar a técnica de cultura de adipócitos em tão pouco tempo e com tamanha dedicação, fazendo desta uma experiência muito enriquecedora.

A *Profa. Dra. Maria Andréia Delbin* pelos ensinamentos de todo o dia e colaborações e pela supervisão na disciplina de Fisiologia Humana II, na qual participei do Programa de Estágio Docente – Pós-Graduação, PED em 2016.

Aos professores da banca de qualificação, *Profa. Dra. Fabíola Taufic Mônica Iglesias, Prof. Dr. Marcelo Mori e Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro*, pela discussão e colaboração no presente trabalho.

A técnica *Dra. Emiriele* e a aluna *Luciana* por compartilharem seu conhecimento sobre cultura celular e na adequação do laboratório para a técnica.

A secretária *Andréia* e *funcionários* da pós-graduação por todo auxílio e ajuda burocrática.

Aos técnicos do departamento, *Francini, Bil, César, Rogério* e em memória ao *Washington*, que cuidam dos nossos animais, sempre mantendo um ambiente limpo e organizado para a manutenção dos animais.

As *faxineiras* por manterem sempre limpo nosso ambiente de trabalho.

Aos *animais* que possibilitaram a realização desse trabalho.

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

## RESUMO

A hiperativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) é uma característica comum em doenças cardiovasculares com hiperatividade simpática como a hipertensão arterial essencial e a insuficiência cardíaca. A estimulação prolongada dos  $\beta$ -AR pode predispor à disfunção vascular associada ao estresse oxidativo, prejuízo na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e ativação do receptor de mineralocorticoides (MR). O tecido adiposo perivascular (PVAT), o qual circunda a maioria dos vasos sanguíneos, sintetiza e libera fatores vasoativos e fisiologicamente apresenta efeito anticontrátil. Porém, na obesidade, na hipertensão arterial e em outras doenças cardiometabólicas, o PVAT encontra-se disfuncional, e pouco se sabe sobre os efeitos da sinalização dos  $\beta$ -AR no PVAT. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da hiperestimulação dos  $\beta$ -AR sobre o papel anticontrátil, produção de NO e equilíbrio redox no PVAT da aorta torácica, e a sinalização celular dos  $\beta$ -AR envolvida. A hiperestimulação dos  $\beta$ -AR *in vivo*, foi realizada em ratos Wistar (3 meses) tratados com veículo (CT) ou com agonista dos  $\beta$ -AR não-seletivo isoproterenol (ISO; 0,3 mg/kg/dia; *s.c.*) por 7 dias. Para investigação dos efeitos da estimulação dos  $\beta$ -AR *in situ*, o PVAT de animais controle foi exposto ao ISO (1  $\mu$ M) nos tempos de 15 min, 6h, 12h e 24h. Os resultados obtidos após os tratamentos *in vivo* demonstraram redução da resposta contrátil à fenilefrina na aorta dos animais CT na presença de PVAT, o que não foi observado nos animais tratados com ISO 7 dias, sugerindo a perda do efeito anticontrátil do PVAT após estimulação crônica dos  $\beta$ -AR. Esse prejuízo funcional induzido pelo tratamento *in vivo* com ISO foi associado a menor expressão dos  $\beta_1$ -AR e da proteína quinase A (PKA), maior expressão dos  $\beta_2$ -AR e da fosforilação de Src e ERK, além de aumento de interleucina-6 no PVAT. O tratamento crônico com isoproterenol *in vivo* ou prolongado (24h) *in situ* resultou em estresse oxidativo e redução de NO associados ao desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no PVAT. A estimulação  $\beta$ -adrenérgica *in vivo* não mudou a concentração de aldosterona no PVAT, mas aumentou a concentração de corticosterona, com aumento da expressão da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenase (11 $\beta$ -HSD1) que regenera glicocorticoides. De maneira análoga, a estimulação com ISO *in situ* (24h) aumentou a expressão da 11 $\beta$ -HSD1. Além disso, a estimulação dos  $\beta$ -AR com ISO por 24h em cultura primária de adipócitos isolados do PVAT aórtico aumentou a liberação de corticosterona. Em conclusão, os dados sugerem que a estimulação crônica dos  $\beta$ -AR prejudica o controle que o PVAT exerce sobre a função vascular, associado a geração de estresse oxidativo, redução da biodisponibilidade de NO e aumento da concentração de corticosterona com maior expressão de 11 $\beta$ -HSD1. Esses efeitos parecem ser independentes de fatores circulantes, uma vez que a ativação prolongada dos  $\beta$ -AR *in vitro* resulta em efeitos similares aos observados *in vivo*. Assim, esses dados estendem o conhecimento sobre a sinalização e efeitos da estimulação  $\beta$ -adrenérgica no PVAT.

**Palavras-chave:** receptores  $\beta$ -adrenérgicos, aorta torácica, corticosterona, tecido adiposo perivascular, óxido nítrico.

## ABSTRACT

$\beta$ -adrenergic receptors ( $\beta$ -AR) overstimulation is a common feature in cardiovascular diseases with sympathetic overactivation such as essential hypertension and heart failure. Prolonged  $\beta$ -AR stimulation predisposes to vascular dysfunction associated with oxidative stress, impaired nitric oxide (NO) bioavailability and mineralocorticoid receptor (MR) activation. The perivascular adipose tissue (PVAT) that is the fat depot surrounding most blood vessels, synthesizes and releases vasoactive factors and physiologically presents anticontractile effect. However, in cardiovascular diseases such as obesity and hypertension PVAT become dysfunctional by mechanisms not completely understood. The aim of this study was to evaluate a possible role of  $\beta$ -AR overstimulation on aortic PVAT anticontractile effect, NO synthesis and bioavailability, and redox state, and the signaling pathway involved in  $\beta$ -AR effects in PVAT. For this purpose, male Wistar rats (3 month) were treated with vehicle (CT) or with a non-selective  $\beta$ -AR agonist isoproterenol (ISO; 0.3 mg/kg/day; *s.c.*) for 7 days, which induces *in vivo*  $\beta$ -AR overstimulation. In addition,  $\beta$ -AR stimulation *in situ* was induced by the exposure to ISO (1  $\mu$ M) for 15min, 6h, 12h and 24h of PVAT from control rats. As first results, we observed that the vasoconstrictor response to phenylephrine in aorta from CT rats was reduced by the presence of PVAT, effect that was not observed in ISO-treated animals, suggesting chronic  $\beta$ -AR stimulation *in vivo* impairs the anticontractile effect of PVAT. The *in vivo* ISO-induced impaired PVAT function was associated with reduced  $\beta_1$ -AR and protein kinase A (PKA) expression, and increased  $\beta_2$ -AR expression, Src and ERK phosphorylation, and interleukin-6 expression in PVAT from ISO-treated rats. In addition, both *in vivo* and *in situ* (24h) ISO exposure generated oxidative stress and impaired NO bioavailability by inducing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling in the aortic PVAT.  $\beta$ -AR overstimulation *in vivo* did not change aldosterone levels in PVAT, but increased corticosterone levels, with increased 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD1) expression, which regenerates glucocorticoids. Likewise, prolonged *in situ* ISO stimulation (24h) increased PVAT 11 $\beta$ -HSD1 expression and increased the amount of corticosterone released by adipocytes isolated from PVAT. These data suggest that chronic  $\beta$ -AR stimulation induces PVAT dysfunction associated with oxidative stress, reduced NO bioavailability and increased corticosterone levels by upregulation of 11 $\beta$ -HSD1. These effects seems to be independent of circulating factors, since *in vitro*  $\beta$ -AR stimulation resulted in similar effects. These data uncover a new role for  $\beta$ -adrenergic stimulation and effects in the PVAT.

**Key Word:**  $\beta$ -adrenergic receptor, thoracic aorta, corticosterone, perivascular adipose tissue, nitric oxide.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Esquema representativo do efeito da ativação aguda (A) e crônica (B) dos receptores $\beta$ -adrenérgicos sobre a atividade e expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Davel et al., 2011) .....	20
<b>Figura 2</b>	(A) Diagrama da composição celular do tecido adiposo perivascular (PVAT): adipócitos do PVAT (amarelo), pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais (vermelho) e células imunes (macrófagos em azul e células T em preto); matriz extracelular formada por colágeno e fibras de elastina (verde). (B) Características fenotípicas do PVAT de aorta torácica (t) e abdominal (a) (Fernández-Alfonso et al., 2018) .....	23
<b>Figura 3</b>	Esquema representativo do tratamento do tecido adiposo perivascular (PVAT) em cultura tecidual.....	31
<b>Figura 4</b>	(A) Imagens histológicas representativas de tecido adiposo perivascular (PVAT) de aorta torácica e tecido adiposo supraespinal (TAS) de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. As imagens foram capturadas em aumento de 20X. As setas pretas indicam os depósitos lipídicos. (B) Expressão proteica da proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1) no PVAT de animais CT e ISO normalizadas pela expressão da $\beta$ -actina. Dados expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais (n) utilizados está indicado dentro das barras. Teste <i>t</i> de Student: * $P < 0,05$ vs. CT.....	41
<b>Figura 5</b>	Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica na presença ou ausência de tecido adiposo perivascular (PVAT) de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. Dados expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais (n) utilizados está indicado entre parênteses. Anova 2-vias: $P < 0,05$ * vs. ISO; # vs. CT+PVAT.....	43
<b>Figura 6</b>	Expressão proteica dos receptores $\beta_1$ -(A), $\beta_2$ -(B) e $\beta_3$ -(C) adrenérgicos (AR) em fração microsomal de membrana, com respectivos controles positivos (C+: coração para $\beta_1$ -AR; músculo sóleo para $\beta_2$ -AR; tecido adiposo supraespinal para $\beta_3$ -AR), e expressão de PKA (D) e fosforilação (p) da Src (E) e ERK1/2 (F) em extrato proteico total de tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. A expressão dos $\beta$ -AR foi normalizada pela coloração das bandas ao Ponceau, as proteínas fosforiladas pela expressão total da proteína correspondente e a PKA pela expressão da $\beta$ -actina. Dados expressos como média $\pm$ EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste <i>t</i> de Student: * $P < 0,05$ vs. CT.....	45

- Figura 7** Expressão proteica da interleucina (IL)-6 (**A**) e do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (**B**) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. A expressão das proteínas foi normalizada pela expressão da  $\beta$ -actina. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste *t* de Student: \*P<0,05 vs. CT..... 47
- Figura 8** Imagens representativas (painel da esquerda) e quantificação (painel da direita) da produção de óxido nítrico avaliada pela fluorescência à diaminofluoresceína (DAF-2) (**A**) e de espécies reativas de oxigênio avaliada pela fluorescência à dihidroetidina (DHE) (**B**) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. Alguns cortes de PVAT foram incubados com L-NAME (1 mM) ou MnTMPyP (25  $\mu$ M) na presença de DHE. Escala= 50  $\mu$ m. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste *t* de Student (DAF) e ANOVA 2-vias (DHE): \*P<0,05 vs. CT; # p<0,05 vs. ISO sem L-NAME..... 49
- Figura 9** Concentração de aldosterona (**A**) e corticosterona (**B**) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. Expressão proteica das enzimas 11 $\beta$ -HSD1 (**C**), 11 $\beta$ -HSD2 (**D**), CYP11B1 (**E**) e CYP11B2 (**F**) no PVAT de animais CT e ISO. A expressão das proteínas foi normalizada pela expressão da  $\beta$ -actina. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste *t* de Student: \*P<0,05 vs. CT..... 51
- Figura 10** Avaliação da produção de NO pela fluorescência a diaminofluoresceína (DAF-2) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição *in situ* com isoproterenol (ISO; 1  $\mu$ M) ou veículo por 15 min (**A**), 6 h (**B**), 12h (**C**) e 24h (**D**). As barras representam média  $\pm$  EPM. O número (n) de animais está indicado dentro das barras. Teste *t* de Student: \*P<0,05 vs. veículo. Imagens representativas da fluorescência ao DAF-2 (10X) estão apresentadas em **E**. Barra branca= 50  $\mu$ m..... 53
- Figura 11** Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pela fluorescência a dihidroetidina (DHE) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição *in situ* com isoproterenol (ISO; 1  $\mu$ M) ou veículo por 15 min (**A**), 6 h (**B**), 12h (**C**) e 24h (**D**). As barras representam média  $\pm$  EPM. O número (n) de

	animais está indicado dentro das barras. Teste <i>t</i> de Student: *P<0,05 vs. veículo. Imagens representativas de DHE (10X) estão apresentadas em E. Barra branca= 50 µm.....	54
<b>Figura 12</b>	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pela fluorescência a dihidroetidina (DHE, barra branca= 50 µm) basal ou com L-NAME em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição <i>in situ</i> com veículo ou isoproterenol (ISO; 1 µM) por 24h. A quantificação encontra-se no painel superior e imagens representativas são apresentadas no painel inferior. As barras representam média ± EPM. O número (n) de animais está indicado dentro das barras. ANOVA 2-vias: *P<0,05.....	55
<b>Figura 13</b>	Expressão proteica das enzimas 11β-HSD1 (A), CYP11B1 (B), 11β-HSD2 (C) e CYP11B2 (D) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica incubado com isoproterenol (1 µM) ou veículo por 15 min, 6h, 12h e 24h. A expressão da proteína foi normalizada pela coloração da membrana ao Ponceau. Dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Teste <i>t</i> de Student; *P<0,05.....	57
<b>Figura 14</b>	Expressão da proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica incubado <i>in situ</i> com isoproterenol (1 µM) ou veículo por 15 min, 6h, 12h e 24h. A expressão da proteína foi normalizada pela coloração da membrana ao Ponceau. Dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Teste <i>t</i> de Student; *P<0,05.....	58
<b>Figura 15</b>	Concentração de corticosterona no meio de cultura primária de adipócitos de tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica incubados com isoproterenol (1 µM) ou veículo por 24h. Os resultados estão apresentados como média ± EPM (3 experimentos, sendo cada amostra referente a um pool de PVAT de 2 ratos). Teste <i>t</i> de Student; *P<0,05 vs. Veículo.....	60
<b>Figura 16</b>	Esquema demonstrando os efeitos da ativação a curto (6h) e longo (24h) prazo dos receptores β-adrenérgicos no tecido adiposo perivascular (PVAT). NO: óxido nítrico; EROs: espécies reativas de oxigênio; eNOS: óxido nítrico sintase isoforma endotelial, 11β-HSD1: 11β- hidroxisteróide dehidrogenase 1.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Índice de hipertrofia ventricular e parâmetros hemodinâmicos avaliados em ratos controle (CT) e tratados por 7 dias com isoproterenol (ISO) ....	38
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros bioquímicos avaliados em ratos controle (CT) e tratados por 7 dias com isoproterenol (ISO) .....	39
<b>Tabela 3</b>	Reposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e logaritmo negativo das concentrações do agonista que produziram 50% do $R_{m\acute{a}x}$ (-Log $EC_{50}$ ) de contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta torácica na presença (+) e ausência (-) de tecido adiposo perivascular (PVAT) de animais tratados com veículo (CT) ou com isoproterenol (ISO) por 7 dias.....	43

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Sinalização dos $\beta$ -AR nas células vasculares.....	17
1.2 O papel do PVAT no controle da função vascular.....	22
1.3 Sinalização dos $\beta$ -AR nos adipócitos.....	24
2 OBJETIVO.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Animais e protocolo de tratamento.....	28
3.2 Medidas hemodinâmicas e índice de hipertrofia ventricular.....	28
3.3 Parâmetros bioquímicos e obtenção de amostras teciduais.....	29
3.4 Histologia do PVAT.....	30
3.5 Reatividade vascular.....	30
3.6 Cultura tecidual de PVAT.....	31
3.7 Cultura primária de adipócitos.....	31
3.8 Medidas de aldosterona e corticosterona.....	32
3.9 Medidas de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	32
3.10 Western blot.....	34
3.10.1 Obtenção de extrato proteico total.....	34
3.10.2 Obtenção de extrato de membrana.....	34
3.10.3 Eletroforese, transferência e detecção de proteínas.....	34
3.11 Drogas.....	36
3.12 Expressão dos dados e análise estatística.....	36

4 RESULTADOS.....	37
4.1 O tratamento com isoproterenol induz hipertrofia cardíaca.....	37
4.2 O tratamento com isoproterenol <i>in vivo</i> reduziu a deposição lipídica no PVAT da aorta torácica.....	40
4.3 O efeito anticontrátil do PVAT é perdido após estimulação crônica dos $\beta$ -AR.....	42
4.4 O tratamento com isoproterenol aumenta a expressão dos $\beta_2$ -AR e da fosforilação da Src e ERK no PVAT da aorta torácica.....	44
4.5 A estimulação crônica dos $\beta$ -AR aumenta a expressão de interleucina-6.....	46
4.6 O tratamento crônico <i>in vivo</i> com isoproterenol reduz a produção de NO e aumenta EROs via desacoplamento da eNOS no PVAT.....	48
4.7 A hiperativação $\beta$ -AR aumenta o conteúdo de corticosterona no PVAT aórtico associado ao aumento da expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1.....	50
4.8 O balanço entre NO e EROs induzido pela estimulação $\beta$ -AR no PVAT ocorre de modo dependente do tempo e independente de fatores circulantes.....	52
4.9 A estimulação prolongada dos $\beta$ -AR aumenta a expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1 e da UCP-1 no PVAT aórtico.....	56
4.10 Adipócitos do PVAT da aorta torácica secretam mais corticosterona em resposta à estimulação $\beta$ -adrenérgica.....	59
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÃO.....	70
7 REFERÊNCIAS.....	71
8 ANEXO.....	84
Anexo A: Validação da utilização da expressão da $\beta$ -actina e coloração ao Ponceau como controles internos para carregamento de proteínas para western-blot.....	84

Anexo B: Artigo 1 – Victorio et al. Hypertension 2016.....	85
Anexo C: Artigo 2 – Victorio et al. Frontiers in Physiology 2016.....	109
Anexo D: Avaliação da produção de NO e EROs no PVAT aórtico de animais eutanasiados entre 18-20h.....	119
Anexo E: Alteração do título da tese.....	121
Anexo F: Parecer da Comissão de ética no Uso de Animais.....	122
Anexo G: Declaração de Direitos Autorais.....	123

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso simpático (SNS) apresenta papel crucial na homeostasia cardiovascular, incluindo o controle do tônus vascular (Manolis et al., 2014). Há sólidas evidências que diversas doenças cardiovasculares (DCV) são acompanhadas por aumento da atividade do SNS como demonstrado no infarto agudo do miocárdio (Graham et al., 2004), na insuficiência cardíaca (Hasking et al., 1986) e na hipertensão arterial (Schlaich et al., 2003; Grassi, 1998). Este quadro também é observado em doenças que são fatores de risco para o desenvolvimento de DCV como a obesidade e a síndrome metabólica (Fisher et al., 2009; Grassi et al., 2007).

As DCV lideram as causas de morte no Brasil (Ribeiro et al., 2016) e no mundo<sup>1</sup>. Por isso, a busca pelos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas DCV e novas terapêuticas é relevante e crescente. Neste contexto, diversos são os trabalhos que indicam o papel da ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) em DCV que cursam com hiperatividade simpática, especialmente na insuficiência cardíaca (Watson et al., 2006). Mais recentemente, dados em animais experimentais tem sugerido que a hiperativação de  $\beta$ -AR também poderia ser um mecanismo associado ao dano vascular (Franco et al., 2017; Victorio et al., 2016b; Davel et al., 2014; Kim et al., 2012).

### 1.1 Sinalização dos $\beta$ -AR nas células vasculares

Os  $\beta$ -AR são receptores de sete domínios transmembranares que pertencem à superfamília dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Os GPCRs apresentam uma estrutura conservada com terminação amino extracelular, terminação carboxil intracelular e sete  $\alpha$ -hélices transmembranares. São descritos três subtipos de  $\beta$ -AR:  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -AR (Lands et al., 1967; Tan et al., 1983). A existência de um quarto subtipo de receptor  $\beta$ -AR ( $\beta_4$ -AR) tem sido proposto, porém sugere-se que este receptor seja um estado atípico do receptor  $\beta_1$ -AR (Granneman, 2001).

Os  $\beta_1$ -AR são o subtipo predominante no coração, correspondendo a 75-80% dos receptores  $\beta$ -AR presentes no tecido cardíaco. Além disso, as células cardíacas também

---

<sup>1</sup> World Health Organization. Disponível em: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/world-heart-day-2017/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day-2017/en/). Acesso 26 de outubro de 2017.

expressam  $\beta_2$ -AR e em uma extensão menor os  $\beta_3$ -AR, com expressão variável com a idade e condição patológica (Barrese & Tagliatela, 2013). A ativação dos  $\beta_1$ -AR no músculo cardíaco resulta em cronotropismo (frequência cardíaca), inotropismo (força de contração) e lusitropismo (velocidade de relaxamento) positivos. Já em vasos sanguíneos, o  $\beta_2$ -AR é descrito como o principal subtipo  $\beta$ -AR expresso nas células endoteliais e no músculo liso vascular da aorta e nas células endoteliais das artérias pulmonares, no qual sua estimulação aguda está associada ao relaxamento vascular (Ferro et al., 2004; Porageaud et al., 2005; Leblais et al., 2008; Perez-Aso et al., 2014). Porém, em geral, os três subtipos  $\beta$ -AR podem ser encontrados em vasos sanguíneos, incluindo grandes artérias como a aorta e vasos de resistência como a artéria mesentérica de resistência e a contribuição de cada subtipo e a via de sinalização envolvida na resposta vasodilatadora diferem entre os leitos vasculares (Flacco et al., 2013). O  $\beta_1$ -AR estão localizados principalmente nas células de músculo liso vascular, onde exerce importante papel vasodilatador nas artérias mesentéricas, femoral, carótida, pulmonar e aorta (Chruscinski et al., 2001; Flacco et al., 2013). Os  $\beta_3$ -AR foram descritos inicialmente no tecido adiposo, atuando na lipólise (Emorine et al., 1989), porém também estão localizados na aorta sendo encontrados na lâmina elástica e em células endoteliais e do músculo liso com proporções variadas de acordo com o leito vascular estudado (Flacco et al., 2013; Perez-Aso et al., 2014).

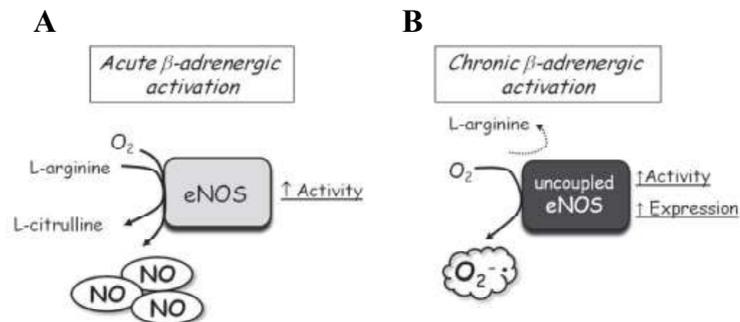
Classicamente, a ligação de agonistas aos  $\beta$ -AR nas células vasculares ativam a cascata de sinalização dependente da proteína  $G\alpha$  estimulatória ( $G\alpha_s$ ), a qual ativa a adenilato ciclase aumentando os níveis de 3', 5' adenosina monofosfato cíclica (AMPc) com consequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (Tanaka et al., 2005). A ativação da via  $G\alpha_s$ /AMPc/PKA induz relaxamento do músculo liso por inibir a formação do complexo cálcio/calmodulina e a fosforilação da quinase da cadeia leve de miosina além de aumentar a recaptção de cálcio para o retículo sarcoplasmático via fosforilação da fosfolambam pela PKA (Tanaka et al., 2005). Além disso, o relaxamento do músculo liso pode ocorrer de modo independente de AMPc via abertura de canais de  $K^+$  resultando em hiperpolarização da membrana (Tanaka et al., 2005). Apesar dos três subtipos de  $\beta$ -AR poderem causar vasodilatação, o subtipo e a via de sinalização ativada podem diferir de acordo com o leito vascular estudado (Flacco et al., 2013). A ativação dos receptores  $\beta_2$ -AR nas células endoteliais da aorta pode culminar com a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS)-isoforma endotelial (eNOS), aumentando a síntese e liberação do fator vasodilatador

óxido nítrico (NO) (Figura 1A) (Queen et al., 2006; Banquet et al., 2011; Flacco et al., 2013). Assim, além do efeito vasodilatador por ação direta no músculo liso, pode haver uma dependência do NO endotelial.

O  $\beta_2$ -AR, além de estar acoplado à proteína G $\alpha_s$ , pode acoplar-se à proteína G $\alpha_i$  inibitória (G $\alpha_i$ ) (Daaka et al., 1997). A estimulação da proteína G $\alpha_i$  pode gerar diferentes sinalizações, dependendo do tipo celular em questão. Em linhagem de células renais humanas (Human Embryonic Kidney 293 cells – HEK293) a estimulação  $\beta_2$ -AR/G $\alpha_i$  causa ativação de Src/Ras e culmina com ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) (Daaka et al., 1997). De acordo, o tratamento com isoproterenol, um agonista dos  $\beta$ -AR não seletivo, pode aumentar a fosforilação (p-) da ERK1/2 em cardiomiócitos e em fibroblastos, e esta sinalização é responsável, ao menos em parte, pela indução de hipertrofia e fibrose cardíaca (Vidal et al., 2012; Hori et al., 2017). A ativação da ERK1/2 em resposta a estimulação dos  $\beta$ -AR também parece ocorrer em vasos sanguíneos. Perez-Aso e colaboradores (2014) demonstraram que a ativação da ERK1/2 em células de músculo liso vascular limita o relaxamento vascular induzido pela ativação dos  $\beta$ -AR na aorta. De acordo com esses dados, a aorta de animais com hiperativação dos  $\beta$ -AR induzida pelo tratamento crônico com isoproterenol apresenta aumento da contração à fenilefrina associado à maior ativação dos receptores  $\beta_2$ -AR, da proteína G $\alpha_i$ , da p-ERK1/2 e redução da biodisponibilidade de NO (Davel et al., 2006, 2014). Em artérias cerebrais, Kim e colaboradores (2006) demonstraram que o tratamento com o isoproterenol induz p-ERK1/2 independentemente de AMPc/PKA e de Ras. Em conjunto, esses estudos sugerem alteração na via de sinalização dos  $\beta$ -AR quando esses receptores são hiperativados.

A hiperativação dos  $\beta$ -AR tem demonstrado causar disfunção vascular. O aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) com consequente redução da biodisponibilidade de NO foram observados na aorta e artéria cerebral de animais após estimulação crônica dos  $\beta$ -AR com isoproterenol o que causou alteração da resposta contrátil a diferentes agonistas (Davel et al., 2006; Kim et al., 2012). O aumento de EROs, especialmente o ânion superóxido, pode reduzir a biodisponibilidade do NO. O NO por apresentar um elétron desemparelhado se torna muito reativo a outras moléculas que também contém um elétron desemparelhado, como é o caso do ânion superóxido, assim o NO é inativado pelo ânion superóxido, resultando na geração de peroxinitrito (Vanhoutte et al., 2016). O aumento da geração de ânion superóxido induzido pelo isoproterenol em artéria de

murinos parece estar associado ao aumento da atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Xu et al., 2008; Kim et al., 2012) e/ou ao desacoplamento da eNOS (Figura 1B) (Davel et al., 2011; 2014; Victorio et al., 2016b).



**Figura 1.** Esquema representativo do efeito da ativação aguda (A) e crônica (B) dos receptores β-adrenérgicos sobre a atividade e expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Davel et al., 2011).

A eNOS é composta por um domínio oxigenase amino-terminal composto por sítios de ligação para o substrato L-arginina e para o cofator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), um grupamento heme e um domínio redutase carboxi-terminal com sítios de ligação para cofatores de flavina (flavina mononucleotídeo e flavina adenina nucleotídeo) e NADPH (Carnicer et al., 2013). A funcionalidade da eNOS se dá pela transferência de elétrons da NADPH, via flavinas, do domínio redutase para o grupamento heme do domínio oxigenase oposto, local onde os elétrons são utilizados para reduzir e ativar O<sub>2</sub> e oxidar L-arginina em L-citrulina e NO (Forstermann & Sessa, 2012). Esta enzima é sintetizada como monômero, porém é necessária a formação de homodímeros para a produção de NO (Vanhoutte et al., 2016). A produção de NO pela eNOS é regulada por diversos fatores como pela expressão da enzima, disponibilidade do substrato L-arginina e do cofator BH<sub>4</sub>, complexo cálcio/calmodulina, interações proteína-proteína como com a chaperona *heat shock protein 90* (HSP90), entre outras modificações pós-traducionais (Kietadisorn et al., 2012). Entretanto, mesmo quando há formação de homodímero pode haver produção de ânion superóxido, ao invés de NO, caso haja reduzidas concentrações do substrato L-arginina, ou do cofator BH<sub>4</sub>, condição referida como desacoplamento da eNOS (Vanhoutte et al., 2016). O desacoplamento da eNOS causa menor síntese do NO e produção de ânion superóxido por esta enzima, que

por sua vez contribui para reduzir a biodisponibilidade do NO (Rodriguez-Crespo et al., 1996; Zou et al., 2002).

A ativação  $\beta$ -adrenérgica pode ativar o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Por sua vez, um aumento na produção de angiotensina II e de aldosterona poderiam mediar os efeitos vasculares da hiperativação  $\beta$ -adrenérgica, uma vez que ambos os hormônios podem causar desacoplamento da eNOS (Leopold et al., 2007; Mollnau et al., 2002). Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa avaliou a participação das vias de sinalização dos receptores  $AT_1$  de angiotensina e do receptor de mineralocorticoides (MR) no desenvolvimento da disfunção vascular induzida pela administração prolongada de isoproterenol *in vivo*. Observamos que as alterações vasculares induzidas pelo tratamento crônico com isoproterenol em aorta torácica de ratos foram prevenidas pelo tratamento com espironolactona, antagonista MR, mas não pelo losartan, antagonista do receptor  $AT_1$ , sugerindo que fatores ligantes do MR poderiam ser liberados em resposta a hiperativação  $\beta$ -adrenérgica e mediar o dano vascular (Victorio et al., 2016b).

Adipócitos expressam as enzimas citocromo P450 aldosterona sintase (CYP11B2) e corticosterona sintase  $11\beta$ -hidroxilase (CYP11B1), enzimas-chave para a etapa final de síntese dos hormônios aldosterona e corticosterona/cortisol, respectivamente. Aldosterona e glicocorticoides são ligantes endógenos do MR, sendo que corticosterona/cortisol podem se ligar tanto ao MR quanto ao receptor de glicocorticoides (GR), porém apresentam maior afinidade ao MR (Fuller et al., 2012). Os adipócitos também expressam a enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenase tipo 1 ( $11\beta$ -HSD1) a qual converte metabólitos  $11$ -dehidro inativos em glicocorticoides ativos e a enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenase tipo 2 ( $11\beta$ -HSD2), a qual oxida glicocorticoides em metabólitos inativos, prevenindo a ativação do MR por glicocorticoides. Assim, apesar de corticosterona/cortisol encontrarem-se em maior concentração do que aldosterona no plasma de mamíferos, fisiologicamente a atividade da  $11\beta$ -HSD2 garante a seletividade do MR pela aldosterona em tecidos onde a enzima é expressa (Fuller et al., 2012). Apesar da seletividade da ligação da aldosterona ao MR conferida pela  $11\beta$ -HSD2, uma alteração do estado redox pode modular a ligação dos glicocorticoides endógenos ao MR (Funder, 2007; Gong et al., 2008). E os glicocorticoides, como o caso do cortisol, pode levar a redução da expressão da eNOS e concomitante redução na produção de NO, sugerindo uma relação entre os níveis teciduais de glicocorticoides e a disfunção vascular (Rogers et al., 2002; Liu et al., 2009).

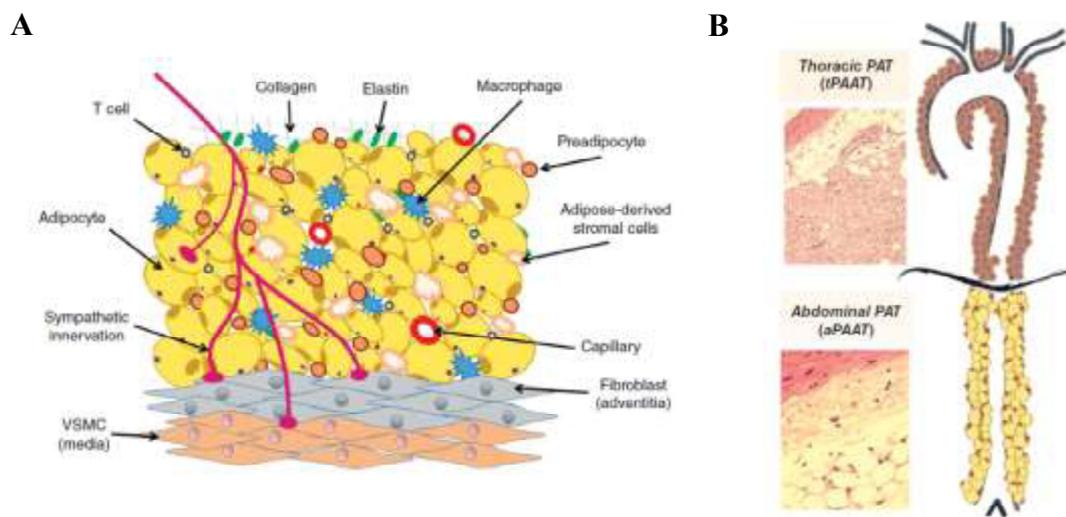
Uma vez que os adipócitos apresentam a maquinaria enzimática necessária para a produção de aldosterona e glicocorticoides, os depósitos de tecido adiposo emergem como possível fonte de fatores ligantes de MR durante a estimulação  $\beta$ -adrenérgica. Dados prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a hiperativação  $\beta$ -AR causa ativação do MR vascular, porém sem modificação nos níveis plasmáticos de aldosterona e corticosterona (Victorio et al., 2016b). Assim, é possível que haja a estimulação da síntese de ligantes endógenos do MR/GR localmente, o que indica um possível papel fisiopatológico para o tecido adiposo que circunda os vasos sanguíneos, o tecido adiposo perivascular (PVAT).

## 1.2 O papel do PVAT no controle da função vascular

O PVAT é um tecido composto por diferentes tipos celulares incluindo adipócitos e uma fração de estroma vascular composta por fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune (Figura 2A) (Szasz et al., 2013). Ele circunda a maioria dos vasos sanguíneos, a exceção de artérias cerebrais (Gao, 2007). As características morfológicas do PVAT variam de acordo com a região anatômica na qual está presente, de modo que o PVAT da aorta torácica apresenta similaridade fenotípica ao tecido adiposo marrom, enquanto que o PVAT que circunda as artérias mesentéricas e a aorta abdominal assemelha-se ao tecido adiposo branco (Figura 2B) (Watts et al., 2011; Padilla et al., 2013). Entretanto, a descrição tradicional do tecido adiposo branco e/ou marrom é insuficiente para classificar, assim como descrever, a função parácrina do PVAT sob os vasos sanguíneos (Szasz et al., 2013).

O PVAT, fisiologicamente, apresenta efeito anticontrátil por secretar várias substâncias vasoativas como adiponectina (Fésus et al., 2007), angiotensina 1-7 (Lee et al., 2009a), leptina (Gálvez-Prieto et al., 2012), sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) (Fang et al., 2009), NO (Xia et al., 2016; Victorio et al., 2016a), fator relaxante derivado do adipócito (ADRF – *adipocyte derived relaxing factor*) (Fésus et al., 2007) e por ativar canais de potássio dependentes de voltagem ( $K_V$ ) (Verlohren et al., 2004; Friederich-Persson et al., 2017). O efeito anticontrátil do PVAT foi descrito primeiramente por Soltis e Cassis (1991) que demonstraram que a presença de PVAT afeta a contratilidade vascular da aorta torácica de ratos. Posteriormente, o efeito anticontrátil do PVAT também foi demonstrado em resposta a vários agentes constritores como agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, serotonina, angiotensina II e U46619 (análogo do tromboxano  $A_2$ ) em aorta torácica de ratos (Lohn et al., 2002), na artéria

mesentérica de ratos e camundongos (Verlohren et al. 2004; Friederich-Persson et al., 2017; Ayala-Lopez et al., 2017) e na artéria torácica interna de humanos (Gao et al., 2005b). Porém, o papel regulatório do PVAT tem sido demonstrado ser específico para cada leito vascular. Neste sentido, o efeito anticontrátil do PVAT na aorta torácica não é observado na aorta abdominal (Victorio et al., 2016a). Os mecanismos envolvidos nesta diferença foram associados a menor expressão de eNOS e produção de NO no PVAT da aorta abdominal comparado ao PVAT da aorta torácica (Victorio et al., 2016a). Assim, a função fisiológica do PVAT varia de acordo com o leito vascular estudado, com a característica do tecido adiposo presente no PVAT e também em qual espécie os efeitos do PVAT estão sendo avaliados.



**Figura 2.** (A) Diagrama da composição celular do tecido adiposo perivascular (PVAT): adipócitos do PVAT (amarelo), pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais (vermelho) e células imunes (macrófagos em azul e células T em preto); matriz extracelular formada por colágeno e fibras de elastina (verde). (B) Características fenotípicas do PVAT de aorta torácica (tPAAT) e abdominal (aPAAT) (Fernández-Alfonso et al., 2018).

Trabalhos sugerem que na hipertensão arterial (Lu et al., 2011, Lee et al., 2009b) e na obesidade (Gao et al., 2005a), a função fisiológica do PVAT pode estar prejudicada e o PVAT pode passar a liberar menos ADRFs e produzir quantidades significativas de EROs, citocinas pró-inflamatórias e fatores contráteis, dentre eles angiotensina II (Gu & Xu, 2013). Os componentes do sistema renina-angiotensina são expressos em diversos tipos celulares, incluindo adipócitos. A abundância de angiotensinogênio em adipócitos equivale a 68% daquela encontrada no fígado, além disso essas células expressam os receptores  $AT_1$  e  $AT_2$

(Lu et al., 2007). Um aumento nos níveis de angiotensina II sistêmico via ativação do receptor AT<sub>1</sub> no tecido adiposo resultam na contribuição deste tecido para aumentar as concentrações de angiotensinogênio e assim de angiotensina II local e sistêmico (Lu et al., 2007). Interessantemente, este mesmo grupo demonstrou que na obesidade o aumento de angiotensinogênio/angiotensina sistêmico é derivado do tecido adiposo, uma vez que a expressão de angiotensinogênio não foi alterada no fígado, demonstrando o papel da síntese e liberação de angiotensina II por adipócitos (Boustany et al., 2004).

Em suma, os fatores liberados pelo PVAT em situações patológicas podem diminuir a biodisponibilidade de NO, como o caso do ânion superóxido, e ainda aumentar a fosforilação da eNOS em sítio de inativação (Payne et al., 2010). Em conjunto, um quadro de inflamação e estresse oxidativo e menor liberação de fatores relaxantes do endotélio são mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento e manutenção da disfunção endotelial e assim, para o agravamento do dano vascular em doenças cardiovasculares (Payne et al., 2010; Szasz et al., 2013). Apesar da importância da hiperativação  $\beta$ -AR em doenças cardiovasculares que cursam com hiperatividade simpática e aumento de catecolaminas circulantes como a hipertensão essencial e a insuficiência cardíaca, pouco se sabe sobre os efeitos da estimulação adrenérgica sobre o PVAT.

### **1.3 Sinalização dos $\beta$ -AR nos adipócitos**

Evidências suportam que o PVAT tem inervação simpática (Bulloch & Daly, 2014; Ayala-Lopez & Watts, 2016). O PVAT da aorta e da artéria mesentérica contém as catecolaminas dopamina, adrenalina e noradrenalina, sendo que esta última apresenta maiores níveis nesses tecidos (Ayala-Lopez et al., 2014). Ao menos em relação a presença de catecolaminas, o PVAT é similar aos depósitos lipídicos clássicos como interescapular (tecido adiposo marrom) e retroperitoneal (tecido adiposo branco) (Ayala-Lopez et al., 2014). O PVAT de artéria mesentérica capta noradrenalina, e esse pode ser um dos mecanismos fisiológicos pelo qual o PVAT induz efeito anticontrátil (Ayala-Lopez et al., 2015). O PVAT apresenta um reservatório funcional de catecolaminas independente de nervos simpáticos (Ayala-Lopez et al., 2014). Apesar da presença de catecolaminas no PVAT, pouco se sabe sobre a distribuição e efeitos dos receptores adrenérgicos neste tecido, assim como sua

possível influência na função vascular em doenças que cursam com a hiperativação simpática (Ayala-Lopez & Watts, 2016).

O entendimento da ativação de  $\beta$ -AR no PVAT atualmente é baseada em estudos com depósitos lipídicos clássicos, como o tecido adiposo supraespinal e o tecido adiposo visceral, dentre eles gonadal, epididimal, entre outros depósitos de tecido adiposo branco (Ayala-Lopez & Watts, 2016). Desse modo, sabe-se que adipócitos do tecido adiposo marrom e branco expressam receptores  $\beta_1$ -  $\beta_2$ - e  $\beta_3$ -AR e medeiam lipólise e termogênese (Levin & Sullivan, 1986; Galitzky et al., 1995; Yang et al., 2004; Granneman et al., 2005). Adicionalmente, a ativação  $\beta$ -adrenérgica em adipócitos branco e/ou marrom lida com a liberação de hormônios, como a leptina e adiponectina. A estimulação aguda dos receptores  $\beta$ -AR cursa com aumento da secreção de adiponectina e redução de leptina em adipócitos 3T3-L1 (Than et al., 2011; Komai et al., 2016). Porém, o balanço entre a liberação/inibição de hormônios pelo PVAT frente a estimulação adrenérgica é pouco esclarecido, bem como sua relevância para o controle do tônus vascular (Aghamohammadzadeh et al., 2012). Sabe-se que a ativação de receptores  $\beta_3$ -AR no PVAT de artéria mesentérica libera um ADRF, o qual os autores sugerem ser a adiponectina (Weston et al., 2013). Entretanto, não se sabe se este perfil é alterado após estimulação crônica dos receptores  $\beta$ -AR, bem como se esta resposta difere em diferentes depósitos de PVAT alterando a função vascular.

A ativação crônica do receptor  $\beta_3$ -AR pode induzir a transdiferenciação de adipócitos brancos em células do tipo marrom, que passam a expressar UCP-1 (*Uncoupling Protein 1*) e maior quantidade de mitocôndrias (Himms-Hagen et al., 2000; Granneman et al., 2005). Este processo é conhecido como *browning* e as células denominadas de bege ou brite (do inglês *brown in white*). Foi demonstrado que pacientes com feocromocitoma, tipo de tumor neuroendócrino que aumenta a secreção de catecolaminas pelas adrenais, apresentam aumento de depósitos de tecido adiposo marrom (Lean et al., 1986), associado à transdiferenciação de adipócitos brancos em marrom (Frontini et al., 2013), ressaltando o papel da hiperativação adrenérgica no controle do fenótipo de adipócitos. O processo do *browning* contribui para maior lipólise e termogênese em animais experimentais expostos ao tratamento com agonista  $\beta_3$ -AR (Himms-Hagen et al., 2000; Granneman et al., 2005). Entretanto, em doenças como a insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (HFpEF) e o câncer associado à caquexia foi demonstrado que a ativação do *browning* pode ser inadequada. Em animais com HFpEF há um prejuízo funcional do tecido adiposo marrom

para regular a temperatura corporal quando exposto ao frio; já animais com caquexia relacionada ao câncer, a ativação  $\beta_3$ -AR contribui para maior dissipação de energia e progressão da caquexia (Petruzzelli et al., 2014; Valero-Muñoz et al., 2016). Em conjunto, esses estudos demonstram a complexidade dos depósitos de tecido adiposo, dentre eles o PVAT, e a necessidade de se elucidar o papel das alterações nesse tecido em doenças que cursam com ativação  $\beta$ -AR.

Neste estudo levantamos a hipótese que a hiperativação dos  $\beta$ -AR no PVAT da aorta torácica pode modular a função vascular por liberar fatores ligantes de MR e por alterar o estado redox do PVAT.

## 2 OBJETIVO

Investigar os efeitos da hiperativação  $\beta$ -adrenérgica no papel anticontrátil, produção de NO e equilíbrio redox do PVAT da aorta torácica e a sinalização celular dos  $\beta$ -AR envolvida. Para isso avaliamos (1) os efeitos do tratamento com o agonista  $\beta$ -AR isoproterenol *in vivo* por 7 dias no papel anticontrátil, morfologia, produção de NO, balanço redox, expressão e via de sinalização dos subtipos de  $\beta$ -AR e síntese de citocinas inflamatórias, de aldosterona e de corticosterona no PVAT aórtico; (2) os efeitos da exposição *in situ* ao isoproterenol na produção de NO, no balanço redox e expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de glicocorticoides e de aldosterona no PVAT aórtico e; (3) os efeitos da exposição *in vitro* ao isoproterenol na produção de corticosterona por cultura primária de adipócitos provenientes do PVAT da aorta torácica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e protocolo de tratamento

Ratos Wistar (30 dias; protocolo CEUA: 3523-1 – ANEXO E e F) foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) na UNICAMP e mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia/ UNICAMP sob condições de temperatura constante ( $22 \pm 2$  °C) e foto-período (12:12 h ciclo claro-escuro) com livre acesso a ração e água. Após aclimatização (~3 dias) no biotério do departamento, um lote de animais foi utilizado para a realização da cultura primária de adipócitos, uma vez que a cultura celular primária de adipócitos requer alta proporção de células mesenquimais não diferenciadas, a qual é encontrada em nos animais nessa idade.

Outro lote de animais foi mantido no biotério até completarem 3 meses de idade para a realização dos demais protocolos experimentais. Ao completarem 3 meses de idade, os animais foram pesados e separados aleatoriamente em 2 grupos para o tratamento *in vivo*: 1) Grupo CT: grupo controle tratado apenas com veículo (óleo de soja; *s.c.*) e 2) Grupo ISO: grupo tratado com isoproterenol (0,3 mg/kg/dia, *s.c.*). Os animais foram tratados por 7 dias consecutivos.

A avaliação tempo-dependente da ativação  $\beta$ -AR *in situ* foi realizada em animais controle (3 meses), como descrito no item 3.6.

#### 3.2 Medidas hemodinâmicas e índice de hipertrofia ventricular

As medidas hemodinâmicas foram realizadas no 8º dia em animais anestesiados com uretana (1,2 g/kg; *i.p.*). Para isso, uma pequena incisão foi realizada no pescoço do animal para isolamento da artéria carótida direita e da veia jugular, as quais foram canuladas com cateter (PE50) preenchido com salina heparinizada. O cateter foi conectado a um transdutor de pressão (MTL844 Ad Instruments) e este a um sistema de aquisição de sinais biológicos (PowerLab 4/35, Ad Instruments) acoplado a um computador para medida e aquisição dos sinais detalhados a seguir. Inicialmente foi realizado a medida de pressão arterial sistólica, diastólica e média (PAM) na carótida e de pressão venosa central (PVC) na

veia jugular. Em seguida, o cateter da carótida foi introduzido no ventrículo esquerdo (VE) e o da veia jugular no ventrículo direito (VD) para medida de pressão ventricular sistólica (PS) e diastólica final (PDf) e derivadas máxima e mínima de pressão pelo tempo (dP/dT) (Rossoni et al., 2006; Davel et al., 2008; 2015).

Após os registros hemodinâmicos, os animais foram exsanguinados sob anestesia, os átrios foram removidos do coração e os ventrículos direito e esquerdo mais o septo ventricular foram pesados. O valor da razão massa ventricular (MV; mg)/ massa corporal (MC; g)<sup>2</sup> foi utilizada como índice de hipertrofia ventricular para comprovar a eficácia do tratamento com isoproterenol.

### 3.3 Parâmetros bioquímicos e obtenção de amostras teciduais

Ao final do período de tratamento os animais foram mantidos em jejum por 12h para medida de glicemia pela veia caudal utilizando tiras para teste de glicemia (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, USA). Em seguida, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilasina (240 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente) e pesados em balança digital (Petit balance MK500C, Chiyo). A eutanásia foi sempre realizada entre 11-12h a fim de evitar a influência das oscilações nos níveis de corticosterona geradas pelo ritmo circadiano, a qual apresenta encontra-se em baixas concentrações nesse período (Atkinson & Waddell, 1997). Após realização de uma incisão peritoneal, sangue arterial foi coletado a partir da aorta abdominal, e então centrifugado (3000 rpm, 15 min a 4°C) e mantido a -80°C para posteriores análises bioquímicas de colesterol e triglicérides total utilizando kit comercial (Roche Molecular Biochemicals, Pleasanton, CA - USA).

Após a coleta do sangue, a aorta torácica com PVAT e o tecido adiposo supraespinal<sup>3</sup> foram removidos para pesagem e colocados sobre uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit (em mM): 118 NaCl; 4,7 KCl; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O; 11 glicose e 0,01 EDTA, previamente gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) e gelada. Os tecidos foram mantidos em gelo e destinados

---

<sup>2</sup> Vale ressaltar que em todos os protocolos experimentais era mensurado o índice de hipertrofia ventricular a fim de comprovar o modelo experimental utilizado.

<sup>3</sup> A nomenclatura supraespinal foi utilizado no estudo baseado no recente trabalho de Zhang e colaboradores (2018). Este estudo se trata de um Atlas de depósito de tecido adiposo em roedores. Vale ressaltar, que na introdução e na discussão, para ser fiel aos trabalhos utilizados, o nome do depósito de tecido adiposo utilizado nos trabalhos referenciados não foi alterado, mantendo-se a nomenclatura utilizada no estudo.

para os experimentos especificados nos próximos tópicos. A massa do PVAT da aorta torácica e o tecido adiposo supraespinal foram normalizados pela massa corporal dos animais.

### 3.4 Histologia do PVAT

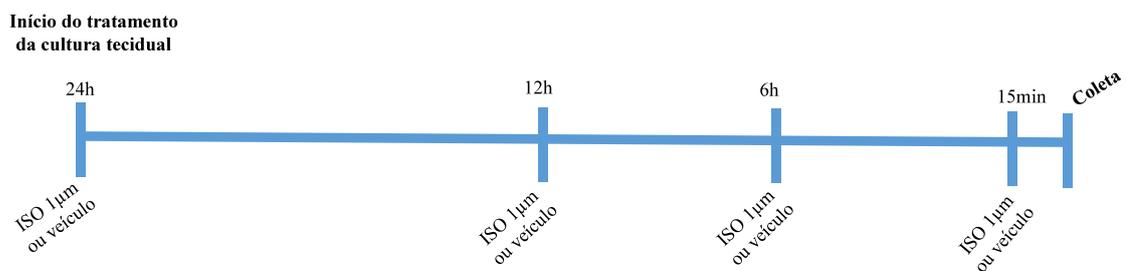
Amostras de PVAT de aorta torácica e de tecido adiposo supraespinal dos animais dos grupos CT e ISO foram fixados em formol (10%) e após no mínimo 24h de fixação em formol os tecidos foram submetidos à desidratação com concentrações crescentes de etanol (70% - 100%) e de xilol e então embebidos em parafina. Em seguida, os cortes (5  $\mu$ m) foram corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse Ti-S no aumento de 20X e fotos típicas foram tiradas com a câmera Nikon Digital Sight DS-U3 acoplada ao microscópio

### 3.5 Reatividade vascular

Aorta torácica dos animais CT e ISO foi dividida em segmentos cilíndricos (3 mm) na presença ou ausência de PVAT. Os segmentos de aorta foram montados em um banho de órgãos isolados (Panlab Havard Apparatus) em cubas contendo 10 ml de solução de Krebs-Henseleit (37°C, constantemente gaseificada com mistura carbogênica 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). A aorta torácica foi mantida em tensão de repouso de 1,0 g. Após estabilização (30 min), a viabilidade do músculo liso vascular da aorta foi testada pela resposta contrátil ao KCl (75 mM) que deve ser ~1g de tensão desenvolvida a mais em relação a tensão de repouso obtida, no grupo controle. Após lavagem com solução de Krebs-Henseleit, a viabilidade do endotélio foi avaliada perante o teste com uma dose de acetilcolina (10  $\mu$ M) em segmentos pré-contraídos com agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina (1  $\mu$ M). Segmentos de aorta que obtiveram relaxamento maior que 80% foram considerados viáveis. Em seguida, os segmentos foram novamente lavados com solução de Krebs-Henseleit, estabilizados (30 min) e então realizada curva concentração-resposta a fenilefrina (0,1 nM – 10  $\mu$ M). A resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e o logaritmo negativo das concentrações do agonista que produziram 50% da  $R_{m\acute{a}x}$  (-Log EC<sub>50</sub>) foram obtidos pela análise da regressão não-linear de cada curva concentração resposta utilizando o software Graph Prism 5.0 (San Diego, EUA).

### 3.6 Cultura tecidual de PVAT

O PVAT foi separado da aorta torácica de ratos Wistar (3 meses) e então lavado em solução de Krebs-Henseleit (pH=7,4) e cortado em 6 segmentos (3 mm) sob fluxo laminar. Cada segmento foi transferido para um poço de placa de 24 poços preenchido com solução DMEM (4,5 g/L de glicose; UltraCruz DMEM, Santa Cruz Biotechnology) suplementado com 10% soro de bezerro recém-nascido, 4 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e estreptomicina, 126  $\mu$ M de ascorbato de sódio e 10 mM HEPES. Em seguida, os segmentos foram incubados com veículo (meio de cultura) ou com isoproterenol (1  $\mu$ M) pelos tempos de 15 min, 6h, 12h e 24h em incubadora (37°C, 8% CO<sub>2</sub>) (Figura 3). Ao final do período de incubação os tecidos foram coletados e armazenados para posteriores medidas de NO, EROs e expressão proteica.



**Figura 3.** Esquema representativo do tratamento do tecido adiposo perivascular (PVAT) em cultura tecidual.

### 3.7 Cultura primária de adipócitos

O PVAT da aorta torácica de ratos Wistar (4 semanas de idade) controle foi isolado e limpo em meio de cultura DMEM em placa de petri. Sob fluxo laminar, o PVAT foi fragmentado e transferido para um falcon contendo solução HEPES (em mM: 100 HEPES; 120 NaCl; 4,8 KCl; 127 CaCl<sub>2</sub>; 4,5 glicose; BSA 1,5%; pH= 7,4) adicionado de colagenase tipo 2 (5 mg/5 mL). A solução foi mantida em banho-maria (37 °C) por 20 min e em intervalos de 5 min era agitada gentilmente em vórtex. Após esse período, a solução foi filtrada usando filtro de 100  $\mu$ m e mantida em gelo por 20 min. Nesse momento, é possível observar na camada superior da solução uma faixa de adipócitos suspensos. Assim, em seguida, sem coletar esses adipócitos suspensos, a solução foi novamente filtrada com filtro

40  $\mu\text{m}$ . A amostra foi centrifugada a 1060 rpm por 10 min a 4°C. O pellet foi ressuspensionado em meio de cultura para diferenciação de adipócitos (DMEM suplementado adicionado de 1  $\mu\text{M}$  rosiglitasona e 4 nM insulina) e transferido para placas de 96 poços mantido em incubadora 8%  $\text{CO}_2$  a 37°C. As células foram mantidas em incubadora por aproximadamente 7 dias até diferenciarem e atingirem confluência de ~80%. Após esse período as células foram colocadas em *starving*, o qual consistia em troca no meio de cultura para DMEM suplementado com redução do soro de bezerro recém-nascido para 1% sem adição de rosiglitasona e insulina por 12h.

As células foram incubadas com isoproterenol 1  $\mu\text{M}$  por 24h em meio DMEM para *starving*. Após esse período o meio de cultura foi coletado para avaliação da concentração de corticosterona.

### **3.8 Medidas de aldosterona e corticosterona**

As concentrações de aldosterona e corticosterona foram determinadas em amostras de PVAT da aorta torácica dos animais CT e ISO tratados por 7 dias e de corticosterona no meio de cultura de adipócitos por kit de ELISA. O PVAT da aorta torácica foi pesado e 100 mg do tecido foi homogeneizado em solução gelada de tampão fosfato (PB; em M: 0,1  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0,1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; pH= 7,4). Em seguida, a concentração de proteínas foi quantificada utilizando reagente de Bradford. O kit de ELISA para determinação da quantidade de aldosterona (kit ELISA Aldosterona, Cayman Chemical 501090) e corticosterona (kit ELISA Corticosterona, Cayman Chemical 501320) foram utilizados seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL/mg de proteína para o PVAT e em pg/mL para o meio de cultura de adipócitos.

### **3.9 Medidas de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs)**

Segmentos de aproximadamente 3 mm de comprimento de PVAT da aorta torácica de animais CT e ISO tratados por 7 dias *in vivo* e PVAT da cultura tecidual exposto ao isoproterenol ou veículo *in situ* foram imersos em meio de congelamento para crioproteção (Tissue-Tek® O.C.T compound 4583) e então congelados imediatamente e mantidos a -80°C até o dia do experimento. Secções (20  $\mu\text{m}$ ) foram obtidas em criostato (-25°C) e coletadas em

lâminas tratadas com silanina. As lâminas com os cortes foram colocadas em uma placa quente a 37°C por 20 minutos para a fixação dos cortes na lâmina.

A produção de NO foi realizada pela análise da fluorescência ao 4,5 – diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) como previamente descrito (Victorio et al., 2016a). Os cortes de PVAT foram incubados por 20 minutos com 100 µL de PB acrescido de 0,45 mM de CaCl<sub>2</sub> em câmara úmida a 37°C. As lâminas foram então vertidas para retirada do tampão e uma nova incubação foi realizada com PB+CaCl<sub>2</sub> e DAF-2 (8 µM) por 30 minutos na câmara úmida a 37°C. Vale ressaltar que o PVAT apresentou autofluorescência quando excitado com o filtro de fluoresceína, entretanto, esta fluorescência foi considerada desprezível.

A avaliação da produção de EROs foi realizada pela análise da fluorescência derivada da oxidação da dihidroetidina (DHE) como previamente descrito (Victorio et al., 2016a). A dihidroetidina permeia livremente pelas células e na presença do ânion superóxido é oxidada à etídio, o qual se intercala ao DNA, emitindo uma fluorescência vermelha quando é excitado em 488 nm e com um espectro de emissão de 610 nm. Para este protocolo, as secções de PVAT foram incubadas por 20 minutos com PB acrescido de ácido dietilenetriaminapentacético (DTPA 100 µM) em câmara úmida a 37°C. Após essa incubação, as lâminas eram vertidas para retirada da solução de PB e uma nova incubação foi realizada com PB+DTPA e DHE (2 µM) por 30 minutos em câmara úmida a 37°C. Alguns cortes de aorta foram incubados com DHE acrescido de L-NAME (1 mM) para avaliar a produção de EROs dependente da eNOS. Para verificar se a fluorescência do DHE era derivada da produção de ânion superóxido, alguns cortes foram incubados com DHE na presença de MnTMPyP (25 µM; D'Agostino *et al.*, 2007), um mimético da superóxido dismutase (SOD).

As imagens foram captadas em microscópio ótico equipado para detecção de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon, Japan), utilizando-se objetiva de 10X acoplada a uma câmera fotográfica (DS-U3, Nikon). Para a fluorescência do DAF-2 foi utilizado filtro de fluoresceína e para a fluorescência do DHE filtro de rodamina. A quantificação da fluorescência foi realizada utilizando-se o software Image J 1.46p (NIH) com as imagens em 8-bit. Mediu-se a densidade integrada em 10 regiões aleatórias de cada corte com área fixa, e a média destes valores foi considerada a medida final de cada amostra analisada.

### 3.10 Western-blot

#### 3.10.1 Obtenção do extrato proteico total

O PVAT da aorta torácica *in vivo* e *in situ* foi pulverizado em nitrogênio líquido em um pilão de aço e em seguida transferido para microtubo contendo tampão de lise RIPA (Upstate, EUA), PMSF (1 mM), ortovanadato de sódio (10 mM), fluoreto de sódio (100 mM), pirofosfato de sódio (10 mM) e coquetel de inibidor de protease (PIC, 2  $\mu$ L/mL). O homogenato foi centrifugado (2500 rpm, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante isolado. Em seguida foi medida a concentração de proteína em uma alíquota (1  $\mu$ L) do extrato (Pierce BCA Protein Assay kit, Rockford, IL, EUA). As amostras (75  $\mu$ g de proteína total) foram adicionadas ao tampão de Laemmli contendo ditioneitol (DTT, 350 mM) e aquecidas a 100°C por 5 minutos para redução e desnaturação das proteínas.

#### 3.10.2 Obtenção do extrato de membrana

A obtenção das proteínas de membrana foi realizada de acordo com protocolo publicado anteriormente (Davel et al., 2014). O PVAT da aorta torácica dos animais tratados *in vivo* com isoproterenol foi pulverizado em nitrogênio líquido em pilão de aço e em seguida transferido para microtubo contendo tampão de lise [em mM: 250 sacarose, 50 TRIS, 1 EDTA (pH = 7,4) e PIC 2 $\mu$ L/mL a 4°C]. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4°C. Logo após, o sobrenadante foi separado e centrifugado a 100.000 g por 60 min a 4°C. O pellet (fração microssomal) foi ressuspenso em tampão TRIS-EDTA (em mM: 50 TRIS, 1 EDTA pH=7,4). O conteúdo de proteína foi quantificado pelo método de Bradford (BioRad). Às amostras (20  $\mu$ g de proteína) foi adicionado tampão de Laemmli contendo DTT 0,1 M, e então as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos para redução e desnaturação das proteínas.

#### 3.10.3 Eletroforese, transferência e detecção de proteínas

As amostras obtidas nos protocolos 3.10.1 e 3.10.2 foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 7,5%; 10%; 12%) em sistema para mini

blot (BioRad, Hercules, USA) contendo solução de corrida (Tris 24 mM; glicina 192 mM; SDS 0,10%) durante aproximadamente 3 horas, a uma corrente constante de 80 Volts (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA, EUA). Em um dos poços do gel foi aplicado padrão de proteínas marcadoras de peso molecular (Thermo Scientific, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 26619). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (polivinil difluorida; Amersham, GE Health Care, U.K.) previamente ativadas por 20 segundos com metanol. Para a transferência, um sistema de *sandwich* foi preparado e imersos em um módulo de transferência (Mini-Protean II, BioRad, Hercules, CA, EUA) contendo solução de transferência (Tris 25 mM; Glicina 190 mM; SDS 0,05% e Metanol 20%). O sistema foi submetido a uma corrente de 230 mA (Power Pac 200, BioRad, Hercules, CA, EUA) por aproximadamente 14 horas.

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução Ponceau 1% por 3 minutos e em seguida escaneadas. A descoloração das membranas foi realizada com uma sequência de lavagens iniciada com ácido acético 1% (5 minutos) seguida por água destilada (5 minutos) e finalizando com solução TBS-T (Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M e Tween 20 0,1%). Em seguida, as membranas foram incubadas por 90 minutos com uma solução de bloqueio (leite desnatado 5%; Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM e Tween-20 0,1%). Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas contendo as amostras de extrato proteico total foram incubadas por 12 horas a 4°C sob agitação com anticorpo primário específico para UCP-1 (1:500), Src (1:1500), <sup>Tyr418</sup>p-Src (1:1000), ERK1/2 (1:1000), <sup>Thr202/Tyr204</sup>p-ERK1/2 (1:2000), TNF- $\alpha$  (1:500), IL-6 (1:500), CYP11B1 (1:500), CYP11B2 (1:500), 11  $\beta$ -HSD1 (1:500), 11  $\beta$ -HSD2 (1:500) e PKA (1:500). As membranas contendo extrato de membrana foram incubadas com anticorpo primário específico para  $\beta_1$ -AR (1:500),  $\beta_2$ -AR (1:500) e  $\beta_3$ -AR (1:500).

As membranas foram lavadas sucessivamente com solução de lavagem (Tris-HCl 10 mM; NaCl 100 mM e Tween 20 0,1%) sob agitação. Posteriormente às lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos (1:5000), sendo estes diluídos em solução de bloqueio e incubados por 90 minutos à temperatura ambiente sob agitação. Após esse período, realizaram-se sucessivas lavagens com solução de lavagem. As proteínas de interesse foram detectadas por uma reação de quimiluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL™ normal ou Plus). Em seguida, as membranas foram colocadas em um fotodocumentador (Alliance 6.7, UVITEC) para a revelação. As imagens foram salvas

para posterior análise densitométrica. Após detecção da expressão das diferentes proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com solução de limpeza (Tris-HCl 62,5 mM; SDS 2%;  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM) por 15 minutos a 50°C e lavadas por duas vezes com TBS-T por 7 minutos. Posteriormente, a membrana foi incubada com a solução de bloqueio e todo o protocolo de incubação foi repetido com anticorpo primário para detecção de  $\beta$ -actina (1:1000). A expressão da  $\beta$ -actina ou a coloração ao Ponceau foram medidas para normalização da expressão das proteínas quantificadas. A utilização desses controles se deve a validação realizada em adipócitos de PVAT aórtico com diferentes concentrações de proteína no qual se demonstrou que a expressão da  $\beta$ -actina e a coloração ao Ponceau são sensíveis à variação de concentração de proteína (ANEXO A).

### 3.11 Drogas

As drogas utilizadas foram da Sigma-Aldrich, exceto: DHE (D23107 Invitrogen), MnTMPyP (Calbiochem), Laemmli (BioRad), ECL<sup>TM</sup> (GE Healthcare). Kits de ELISA e rosiglitazona (Cayman Chemical Company). Anticorpos para o ensaio de Western blot: eNOS (BD Bioscience). CYP11B2, CYP11B1 e Src (Millipore). <sup>Tyr418</sup>p-Src (Invitrogen). ERK1/2 e <sup>Thr202/Tyr204</sup>p-ERK1/2 (Cell Signaling).  $\beta$ -actina, os subtipos de  $\beta$ -AR, 11 $\beta$ -HSD1 e 2, UCP-1 e PKA (Santa Cruz). IL-6 (Abcam). TNF- $\alpha$  (Biolegend). DMEM (Santa Cruz).

### 3.12 Expressão dos dados e análise estatística

Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM e analisados por teste *t* de Student, ANOVA 2-vias seguida de teste post-hoc Bonferroni utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 4. RESULTADOS

Parte dos resultados obtidos com o desenvolvimento da presente tese de doutorado foram publicados nos artigos Victorio et al. Hypertension 2016 (Victorio et al. 2016b; ANEXO B) e Victorio et al. Frontiers in Physiology 2016 (Victorio et al. 2016a; ANEXO C). No presente texto de tese apresentamos dados inéditos não publicados, à exceção das figuras 3, 6a e 7.

### 4.1 O tratamento com isoproterenol induz hipertrofia cardíaca

A eficácia do tratamento com isoproterenol foi confirmada através da verificação do índice de hipertrofia cardíaca, pela medida da razão da massa ventricular/ massa corporal. Após os 7 dias de tratamento com isoproterenol, como esperado, os animais apresentaram hipertrofia cardíaca, evidenciada pelo aumento de 26,4% da razão massa ventricular/ massa corporal comparado ao grupo controle (Tabela 1). A avaliação da massa corporal dos animais ao longo dos 7 dias de tratamento com isoproterenol não apresentou diferenças quando comparado ao grupo controle (CT =  $443 \pm 10$  vs. ISO =  $424 \pm 9$  g,  $P > 0,05$ ).

Também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos valores de pressão venosa central, pressão arterial média e nos parâmetros hemodinâmicos dos ventrículos esquerdo e direito entre os grupos estudados (Tabela 1).

O tratamento com isoproterenol não foi capaz de alterar significativamente os níveis plasmáticos de triglicérides e de colesterol total e nem a glicemia de jejum comparado ao grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 1:** Índice de hipertrofia ventricular e parâmetros hemodinâmicos avaliados em ratos controle (CT) e tratados por 7 dias com isoproterenol (ISO).

	CT	ISO
<b>Índice de hipertrofia ventricular</b>		
MV/MC (mg/g)	2,50 ± 0,12	3,16 ± 0,12*
<b>Jugular e VD</b>		
PVC (mmHg)	-1,2 ± 0,82	0,8 ± 0,89
PS-VD (mmHg)	34,2 ± 2,9	44,4 ± 10,7
PDf-VD (mmHg)	3,2 ± 1,3	1,5 ± 1,5
dP/dt+ (mmHg/s)	1070 ± 83	1767 ± 432
dP/dt- (mmHg/s)	-830 ± 178	-1565 ± 389
<b>Carótida e VE</b>		
PAM (mmHg)	99 ± 2,9	98 ± 2,6
PS-VE (mmHg)	145 ± 3,3	150 ± 3,1
PDf-VE (mmHg)	3,5 ± 0,4	4,0 ± 0,9
dP/dt+ (mmHg/s)	8684 ± 567	10950 ± 758
dP/dt- (mmHg/s)	-5199 ± 268	-5895 ± 264

MV: massa ventricular; MC: massa corporal; VD: ventrículo direito; PVC: pressão venosa central; PS: pressão sistólica; PDf: pressão diastólica final; dP/dt+: derivada máxima de pressão pelo tempo; dP/dt-: derivada mínima de pressão pelo tempo; PAM: pressão arterial média; VE: ventrículo esquerdo. Dados expressos como média ± EPM (n=4 por grupo). Teste *t* de Student, P<0,05 \*vs. CT.

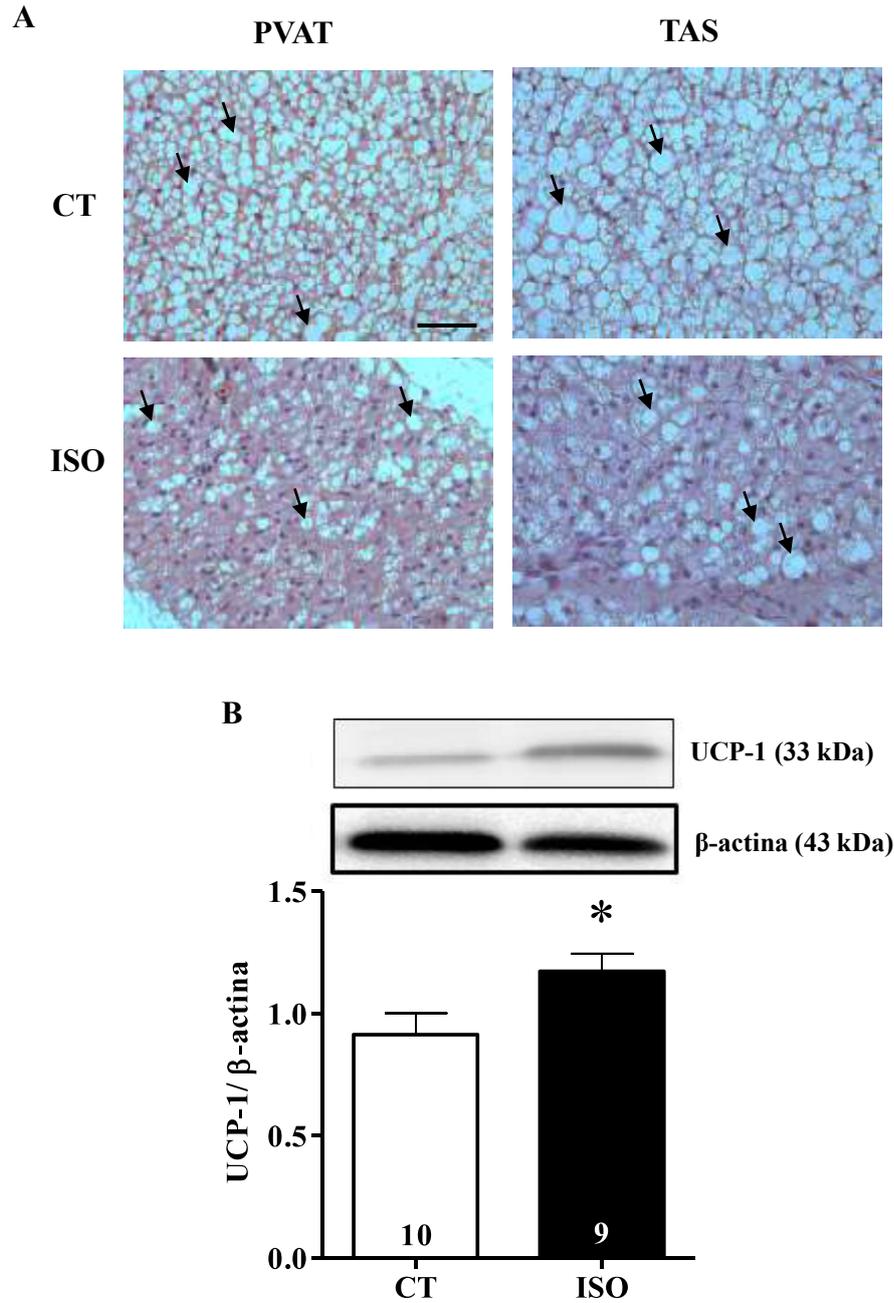
**Tabela 2:** Parâmetros bioquímicos avaliados em ratos controle (CT) e tratados por 7 dias com isoproterenol (ISO).

	<b>CT</b>	<b>ISO</b>
Triglicérides plasmático (mg/dL)	105,2 ± 13,0	76,8 ± 12,0
Colesterol plasmático (mg/dL)	107,7 ± 10,3	121,2 ± 13,6
Glicemia de jejum (mg/dL)	84,0 ± 4,4	76,7 ± 4,2

Dados expressos como média ± EPM (n=4-7 por grupo). Teste *t* de Student, P>0,05.

#### **4.2 O tratamento com isoproterenol *in vivo* reduziu a deposição lipídica no PVAT da aorta torácica**

A análise histológica do PVAT da aorta torácica e do tecido adiposo supraespinal demonstrou similaridades fenotípicas entre esses dois depósitos de gordura (Figura 4A). O tratamento *in vivo* por 7 dias com isoproterenol resultou em redução na deposição lipídica em ambos os tecidos (Figura 4A), independente de alteração na massa tecidual do PVAT (CT=  $7,0 \pm 0,5$  vs. ISO =  $7,7 \pm 0,5$  mg/g massa corporal;  $P > 0,05$ ; n=8-10 por grupo) ou do tecido adiposo supraespinal (CT=  $1,0 \pm 0,05$  vs. ISO =  $1,1 \pm 0,09$  mg/g massa corporal;  $P > 0,05$ ; n=8-9 por grupo). Adicionalmente, a expressão proteica da UCP-1 no PVAT da aorta torácica foi aumentada após 7 dias de tratamento com isoproterenol, quando comparado ao grupo controle (Figura 4B).



**Figura 4.** (A) Imagens histológicas representativas de tecido adiposo perivascular (PVAT) de aorta torácica e tecido adiposo supraespinal (TAS) de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. As imagens foram capturadas em aumento de 40X. As setas pretas indicam os depósitos lipídicos. Escala = 50  $\mu$ m. (B) Expressão proteica da proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1) no PVAT de animais CT e ISO normalizada pela expressão da  $\beta$ -actina. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados está indicado dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. CT.

### 4.3 O efeito anticontrátil do PVAT é perdido após estimulação crônica dos $\beta$ -AR

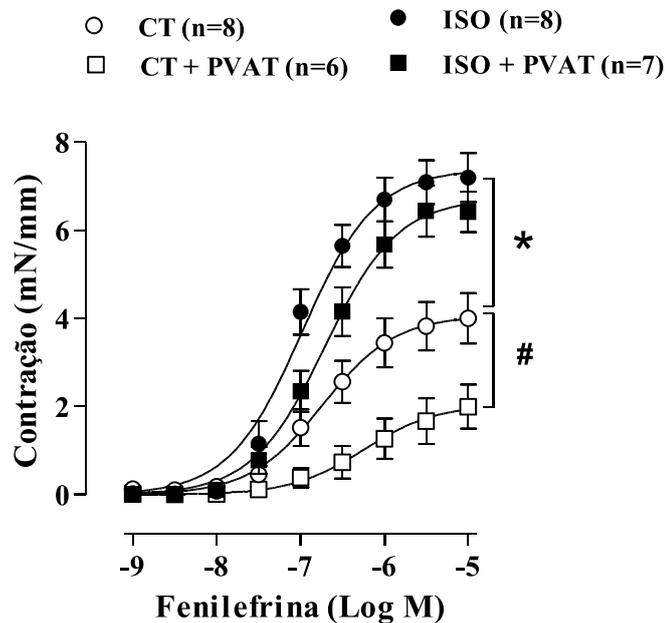
A contratilidade de segmentos de aorta torácica foi avaliada na presença e ausência de PVAT.

Como previamente publicado (Lohn et al., 2002), a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de aorta torácica na presença de PVAT foi menor quando comparada à ausência de PVAT no grupo controle quando avaliado a  $R_{\text{máx}}$  e  $-\text{Log EC}_{50}$  (Figura 5 e Tabela 3), indicando o papel anticontrátil desse tecido. O tratamento *in vivo* com isoproterenol causou aumento na contração induzida pela fenilefrina em segmentos sem PVAT comparado ao grupo controle (Figura 5 e Tabela 3) com aumento de  $R_{\text{máx}}$  mas sem alterar  $-\text{Log EC}_{50}$ , e a presença de PVAT não foi capaz de alterar esses parâmetros no grupo ISO (Figura 5 e Tabela 3). Esse dado sugere uma perda do efeito anticontrátil do PVAT da aorta torácica dos animais com hiperestimulação  $\beta$ -adrenérgica.

**Tabela 3** Reposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e logaritmo negativo das concentrações do agonista que produziram 50% do  $R_{m\acute{a}x}$  ( $-\text{Log EC}_{50}$ ) de contração induzida pela fenilefrina em anéis de aorta torácica na presença (+) e ausência (-) de tecido adiposo perivascular (PVAT) de animais tratados com veículo (CT) ou com isoproterenol (ISO) por 7 dias.

		CT	ISO
PVAT-	$R_{m\acute{a}x}$	$4,0 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,5^*$
	$-\text{Log EC}_{50}$	$6,6 \pm 0,07$	$6,9 \pm 0,07$
PVAT+	$R_{m\acute{a}x}$	$2,0 \pm 0,4 \#$	$6,7 \pm 0,5^*$
	$-\text{Log EC}_{50}$	$5,4 \pm 0,7 \#$	$6,6 \pm 0,1^*$

Dados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA 2-vias  $P < 0,05$ : # vs PVAT-; \* vs CT.

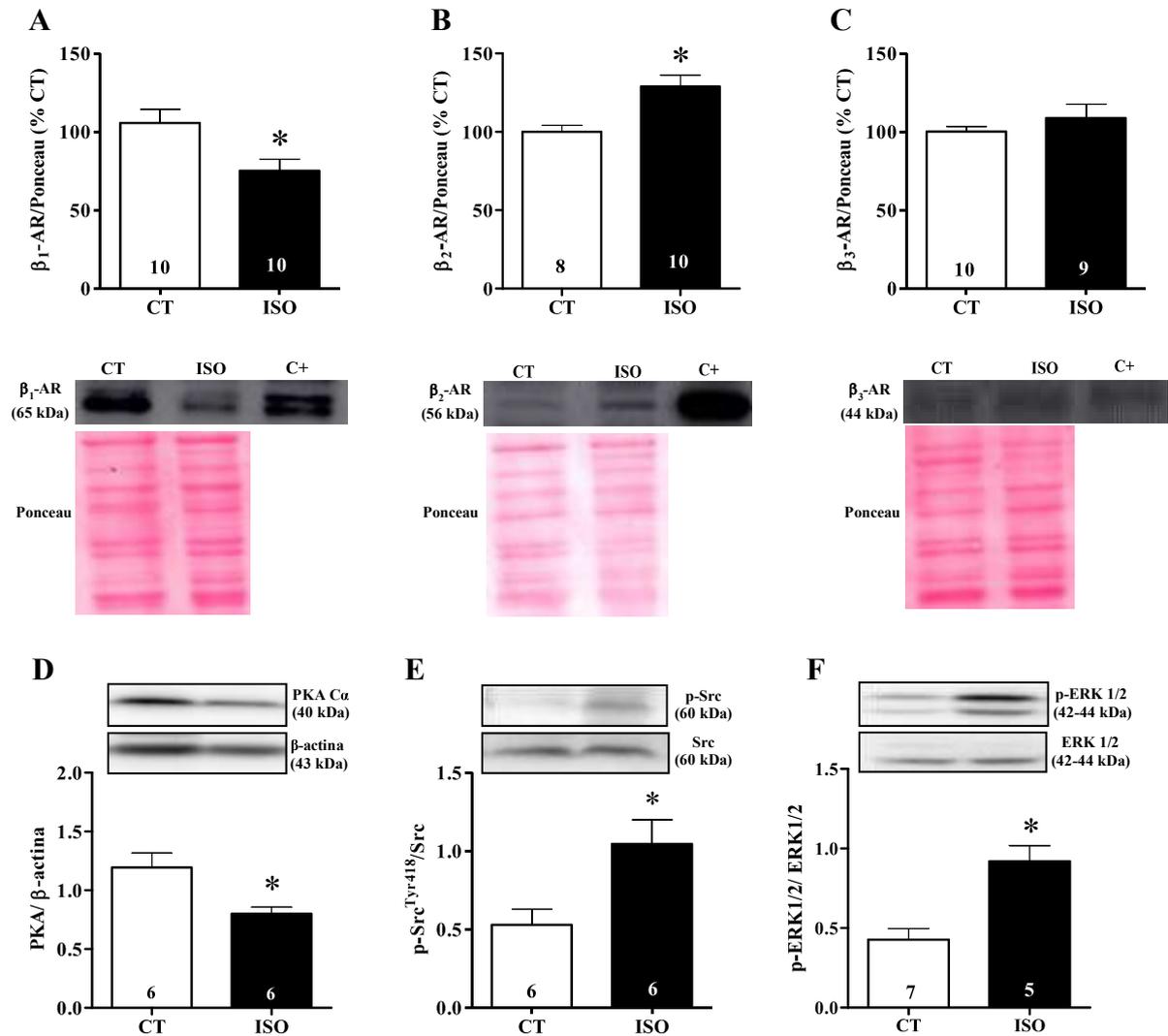


**Figura 5.** Curvas concentração-resposta à fenilefrina em segmentos de aorta torácica na presença ou ausência de tecido adiposo perivascular (PVAT) de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados está indicado entre parênteses. ANOVA 2-vias:  $P < 0,05$  \* vs. ISO; # vs. CT+PVAT.

#### **4.4 O tratamento com isoproterenol aumenta a expressão dos $\beta_2$ -AR e da fosforilação da Src e ERK no PVAT da aorta torácica**

A avaliação da expressão dos três subtipos de  $\beta$ -AR foi realizada na fração microssomal do PVAT da aorta torácica (Figura 6 A-C). O tratamento com isoproterenol *in vivo* por 7 dias resultou na redução da expressão do subtipo  $\beta_1$ -AR (Figura 6A), enquanto que aumentou a expressão do subtipo  $\beta_2$ -AR (Figura 6B), sem alterar a expressão do subtipo  $\beta_3$ -AR (Figura 6C), em comparação ao grupo CT.

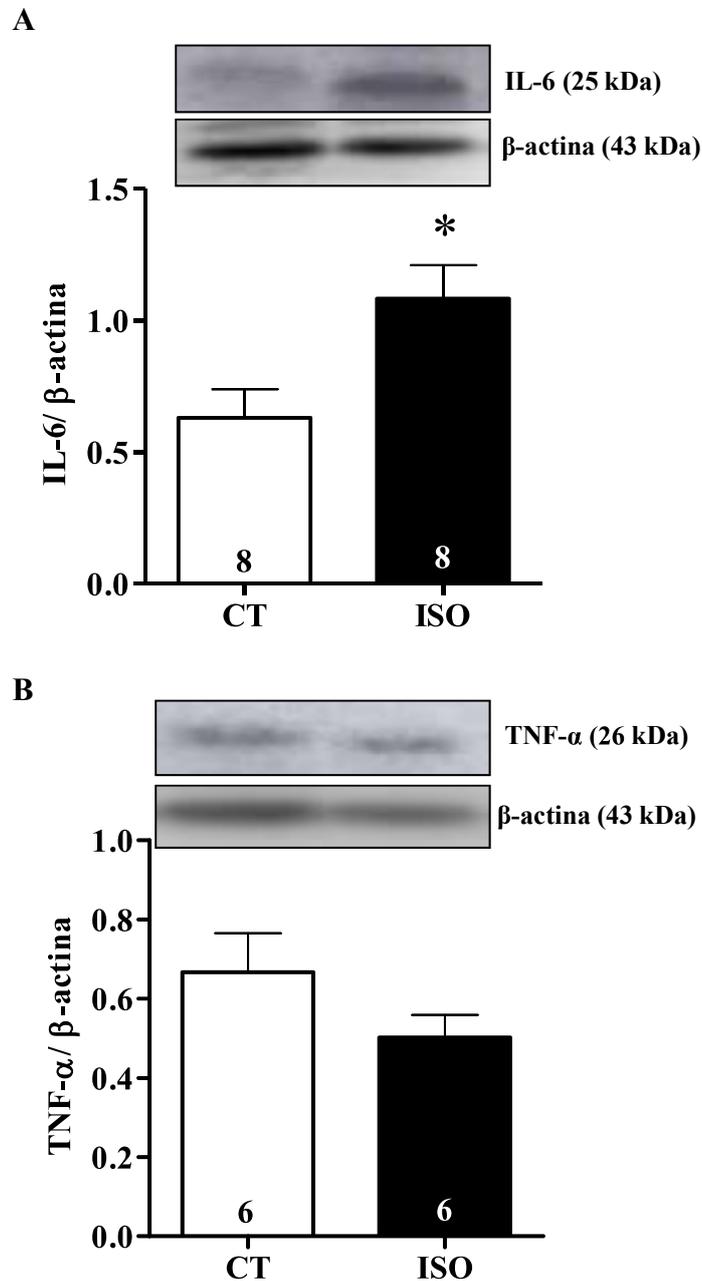
A expressão da PKA $\alpha$  catalítica foi reduzida (Figura 6D), enquanto que a fosforilação das proteínas Src (Figura 6D) e ERK1/2 (Figura 6E) foram aumentadas após estimulação crônica *in vivo* dos receptores  $\beta$ -AR em comparação ao grupo CT. A expressão total de Src e de ERK1/2 não foram significativamente diferentes entre os grupos.



**Figura 6.** Expressão proteica dos receptores  $\beta_1$ -(A),  $\beta_2$ -(B) e  $\beta_3$ -(C) adrenérgicos (AR) em fração microssomal de membrana, com respectivos controles positivos (C+: coração para  $\beta_1$ -AR; músculo sóleo para  $\beta_2$ -AR; tecido adiposo supraespinal para  $\beta_3$ -AR), e expressão de PKA (D) e fosforilação (p) da Src (E) e ERK1/2 (F) em extrato proteico total de tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. A expressão dos  $\beta$ -AR foi normalizada pela coloração das bandas ao Ponceau, as proteínas fosforiladas pela expressão total da proteína correspondente e a PKA pela expressão da  $\beta$ -actina. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. CT.

#### **4.5 A estimulação crônica dos $\beta$ -AR aumenta a expressão de interleucina-6**

A avaliação da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  no PVAT da aorta torácica foi realizada. O tratamento *in vivo* com isoproterenol por 7 dias resultou no aumento da expressão proteica da IL-6 (Figura 7A) sem alteração da expressão do TNF- $\alpha$  (Figura 7B) comparado ao grupo CT.

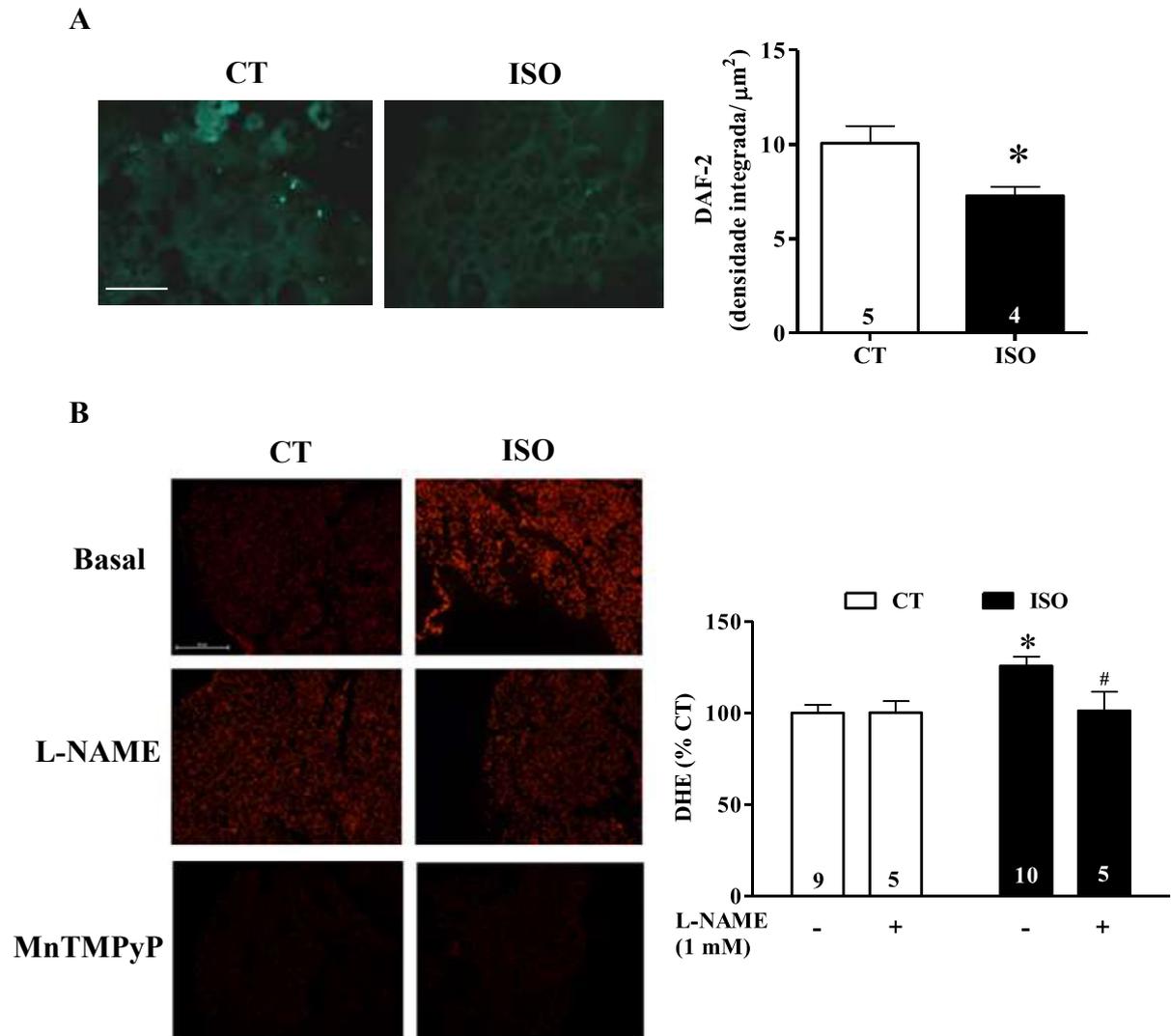


**Figura 7.** Expressão proteica da interleucina (IL)-6 (A) e do fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  (B) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. A expressão das proteínas foi normalizada pela expressão da  $\beta$ -actina. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. CT.

#### **4.6 O tratamento crônico *in vivo* com isoproterenol reduz a produção de NO e aumenta EROs via desacoplamento da eNOS no PVAT**

O tratamento com isoproterenol *in vivo* reduziu em 27% a fluorescência ao DAF-2, demonstrando redução na produção de NO no PVAT da aorta torácica (Figura 8A) comparado ao grupo CT.

A produção de EROs foi aumentada em 25% após estimulação crônica dos  $\beta$ -AR no PVAT da aorta torácica (Figura 8B) quando comparada ao grupo CT. A incubação prévia do PVAT com L-NAME aboliu a diferença entre os grupos (Figura 8B), sugerindo a participação da eNOS na geração de estresse oxidativo no PVAT após estimulação  $\beta$ -AR. A incubação com o mimético da SOD MnTMPyP reduziu a fluorescência nos cortes de PVAT tanto do grupo ISO quanto do grupo CT (Figura 8B), indicando que o ânion superóxido foi a principal ERO detectada por esta metodologia no PVAT.



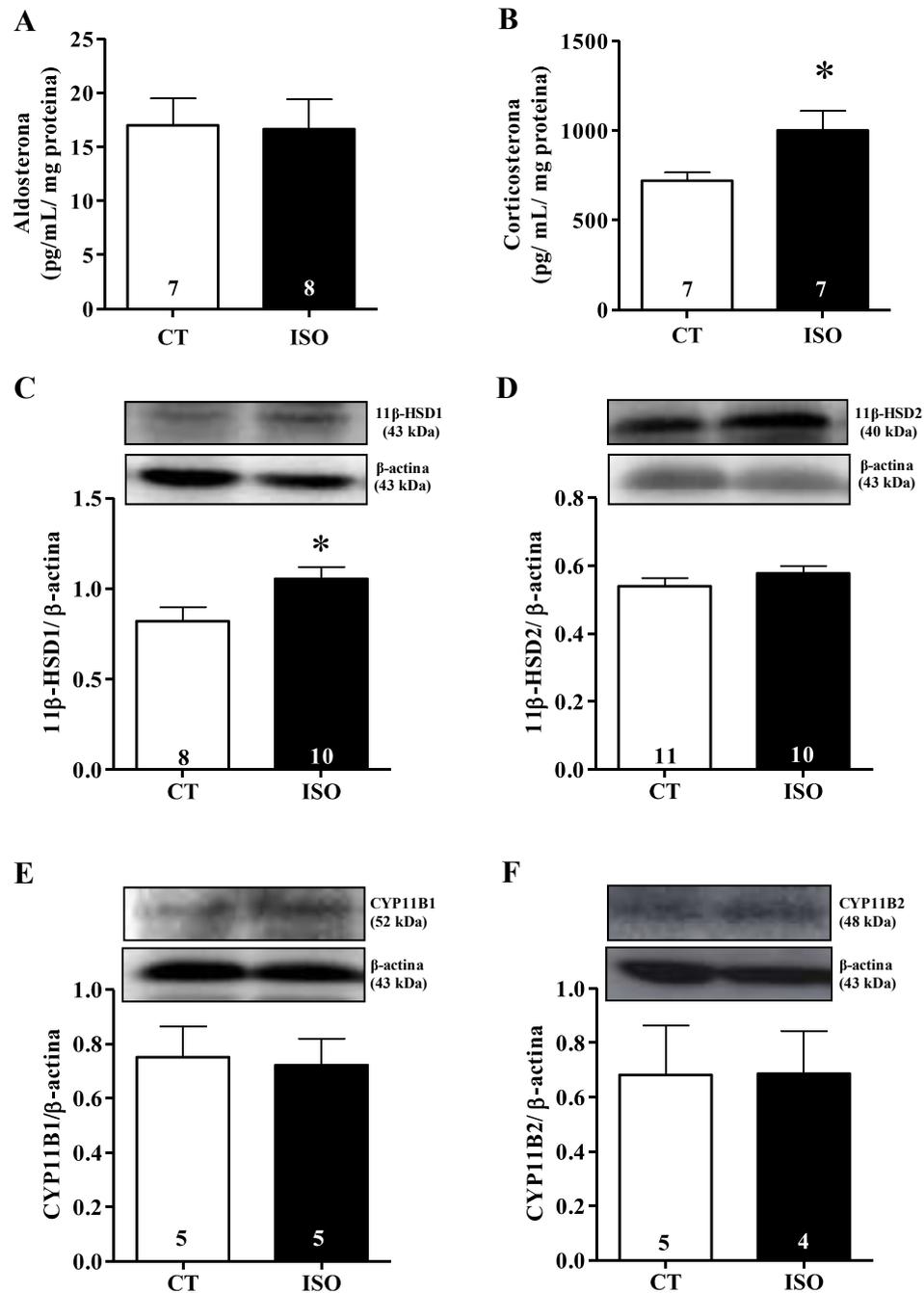
**Figura 8.** Imagens representativas (painel da esquerda) e quantificação (painel da direita) da produção de óxido nítrico avaliada pela fluorescência à diaminofluoresceína (DAF-2) (A) e de espécies reativas de oxigênio avaliada pela fluorescência à dihidroetidina (DHE) (B) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. Alguns cortes de PVAT foram incubados com L-NAME (1 mM) ou MnTMPyP (25  $\mu\text{M}$ ) na presença de DHE. Escala= 50  $\mu\text{m}$ . Dados expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste *t* de Student (DAF) e ANOVA 2-vias (DHE): \* $P < 0,05$  vs. CT; #  $P < 0,05$  vs. ISO sem L-NAME.

#### **4.7 A hiperativação $\beta$ -AR aumenta o conteúdo de corticosterona no PVAT aórtico associado ao aumento da expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1**

O tratamento com isoproterenol *in vivo* por 7 dias não modificou a concentração de aldosterona no PVAT comparado ao grupo CT (Figura 9A), ao passo que aumentou a concentração de corticosterona neste tecido (Figura 9B). Os níveis plasmáticos desses hormônios não foram alterados pelo tratamento com isoproterenol (Victorio et al., 2016b).

Em seguida avaliamos os componentes do metabolismo de esteroides pela expressão proteica da aldosterona sintase (CYP11B2) e da corticosterona sintase 11 $\beta$ -hidroxilase (CYP11B1) no PVAT, enzimas chaves para etapa final de síntese de aldosterona e corticosterona, respectivamente. Ademais, avaliamos a expressão da enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteróide dehidrogenase 1 (11 $\beta$ -HSD1) a qual converte metabólitos 11-dehidro inativos em glicocorticoides ativos e a enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteróide dehidrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD2) a qual oxida corticosterona ativa em metabólitos inativos, prevenindo a ativação do MR por glicocorticoides.

O tratamento com o isoproterenol aumentou a expressão proteica da enzima 11 $\beta$ -HSD1 (Figura 9C), sem alterar a expressão das enzimas 11 $\beta$ -HSD2 (Figura 9D), CYP11B1 (Figura 9E) e CYP11B2 (Figura 9F) em comparação ao grupo CT.



**Figura 9.** Concentração de aldosterona (A) e corticosterona (B) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica de animais controle (CT) e tratados com isoproterenol (ISO) por 7 dias. Expressão proteica das enzimas 11β-HSD1 (C), 11β-HSD2 (D), CYP11B1 (E) e CYP11B2 (F) no PVAT de animais CT e ISO. A expressão das proteínas foi normalizada pela expressão da β-actina. Dados expressos como média ± EPM. O número de animais (n) utilizados encontra-se dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. CT.

#### **4.8 O balanço entre NO e EROs induzido pela estimulação $\beta$ -AR no PVAT ocorre de modo dependente do tempo e independente de fatores circulantes**

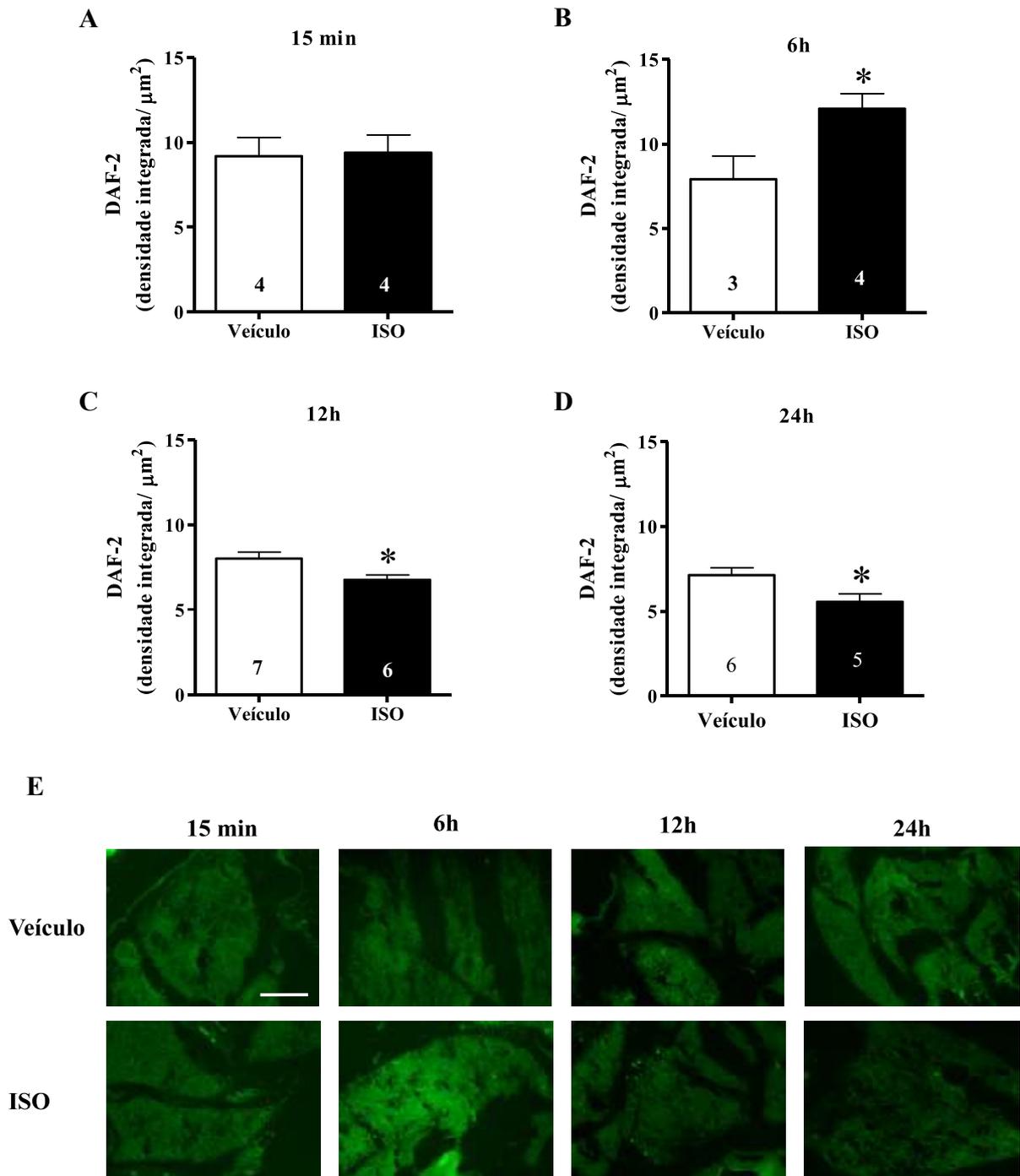
A fim de avaliar se as alterações observadas no PVAT de animais tratados por 7 dias com isoproterenol eram independentes de alterações sistêmicas induzidas pela estimulação  $\beta$ -adrenérgica, expomos o PVAT de animais controle *in situ* a 1  $\mu$ M de isoproterenol por diferentes tempos e analisamos a produção de NO e EROs por esse tecido em cada tempo estudado.

A exposição *in situ* ao isoproterenol por 15 min não alterou a produção de NO quando comparado ao grupo veículo (Figura 10A, E), enquanto que após 6h houve um aumento do NO em resposta a estimulação  $\beta$ -adrenérgica no PVAT (Figura 10B, E). Já a exposição mais prolongada ao isoproterenol, por 12h (Figura 10C, E) e 24h (Figura 10D, E), causou redução dos níveis de NO.

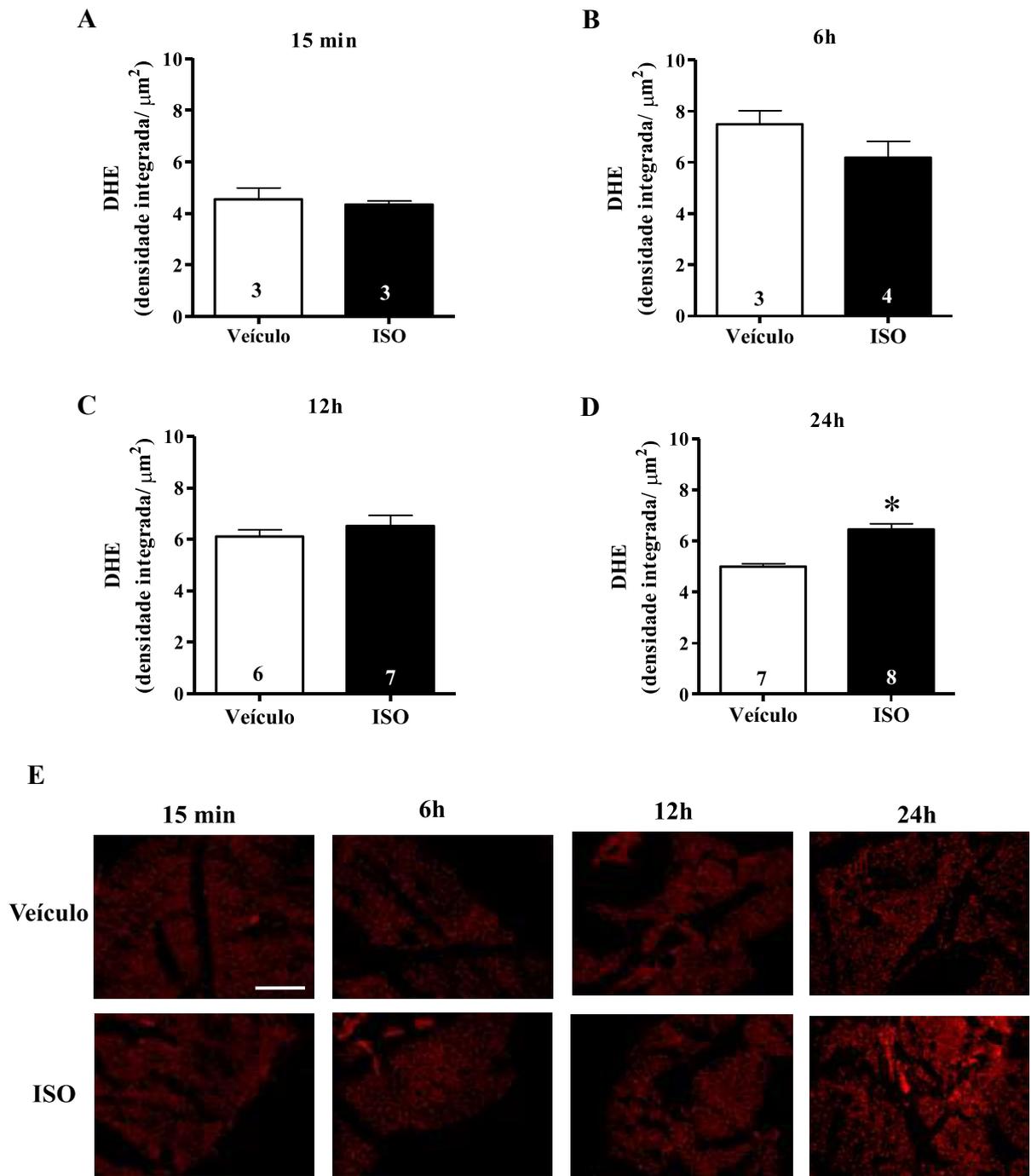
A avaliação da produção de EROs frente a estimulação tempo-dependente dos  $\beta$ -AR não apresentou diferença em comparação à situação veículo nos tempos 15 min (Figura 11A, E), 6h (Figura 11B, E) e 12h (Figura 11C, E). A exposição por 24h ao isoproterenol resultou em aumento de EROs (Figura 11D, E).

Cortes de PVAT veículo e isoproterenol 24h foram incubados com L-NAME, inibidor da NOS, para avaliação da geração de EROs derivada desta enzima. A incubação com L-NAME aboliu a diferença na fluorescência ao DHE entre os dois grupos (Figura 12). Em conjunto os dados sugerem que a estimulação  $\beta$ -AR *in situ* é capaz de gerar estresse oxidativo associado ao desacoplamento da eNOS similar ao observado pelo tratamento crônico com isoproterenol *in vivo* (Figura 8B).

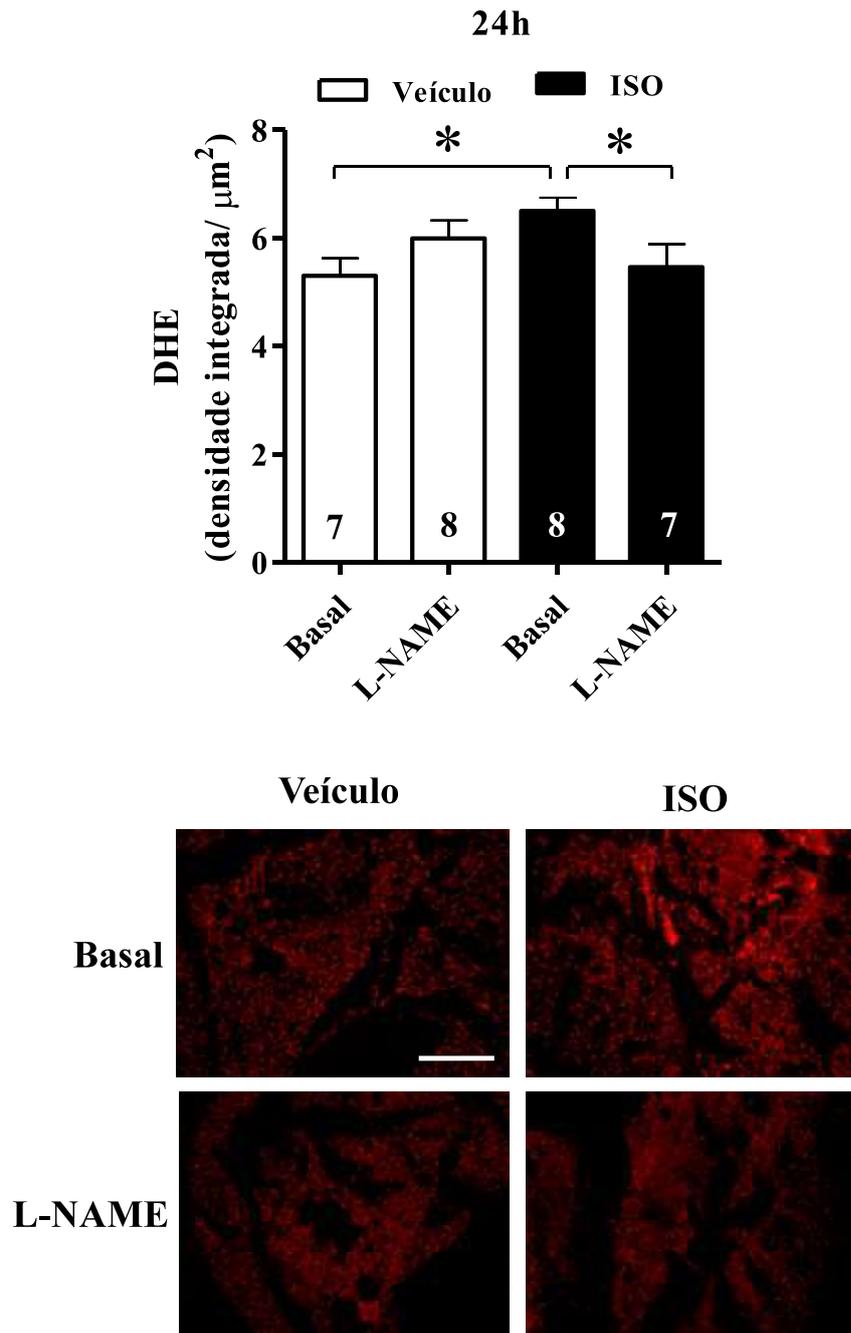
Vale ressaltar que identificamos que a produção de NO e EROs basal não sofre interferência do ritmo circadiano da corticosterona, avaliado em animais eutanasiados entre 18-20h (ANEXO D). Mesmo assim, optamos pela análise de dados provenientes de animais eutanasiados entre 11-12h para descartar as oscilações do ritmo circadiano sobre a avaliação das proteínas que regulam a síntese de corticosterona.



**Figura 10.** Avaliação da produção de NO pela fluorescência a diaminofluoreceína (DAF-2) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição *in situ* com isoproterenol (ISO; 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 15 min (**A**), 6 h (**B**), 12h (**C**) e 24h (**D**). As barras representam média  $\pm$  EPM. O número (n) de animais está indicado dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. veículo. Imagens representativas da fluorescência ao DAF-2 (10X) estão apresentadas em **E**. Barra branca = 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 11.** Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio pela fluorescência a dihidroetidina (DHE) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição *in situ* com isoproterenol (ISO; 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 15 min (A), 6 h (B), 12h (C) e 24h (D). As barras representam média  $\pm$  EPM. O número (n) de animais está indicado dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. veículo. Imagens representativas de DHE (10X) estão apresentadas em E. Barra branca = 50  $\mu\text{m}$ .



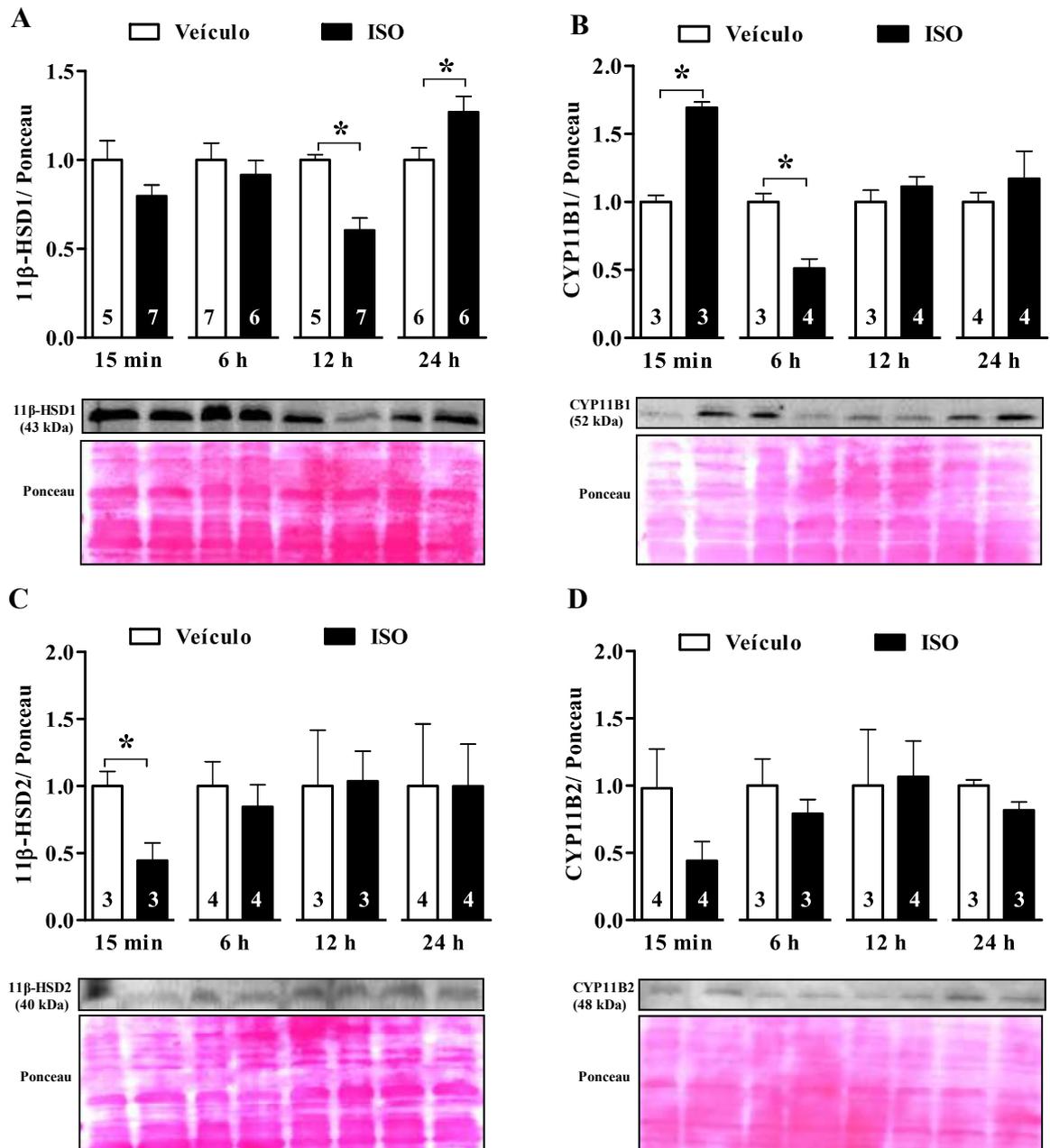
**Figura 12.** Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio pela fluorescência a dihidroetidina (DHE, barra branca= 50  $\mu\text{m}$ ) basal ou com L-NAME em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição *in situ* com veículo ou isoproterenol (ISO; 1  $\mu\text{M}$ ) por 24h. A quantificação encontra-se no painel superior e imagens representativas são apresentadas no painel inferior. As barras representam média  $\pm$  EPM. O número (n) de animais está indicado dentro das barras. ANOVA 2-vias: \*P<0,05.

#### **4.9 A estimulação prolongada dos $\beta$ -AR aumenta a expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1 e da UCP-1 no PVAT aórtico**

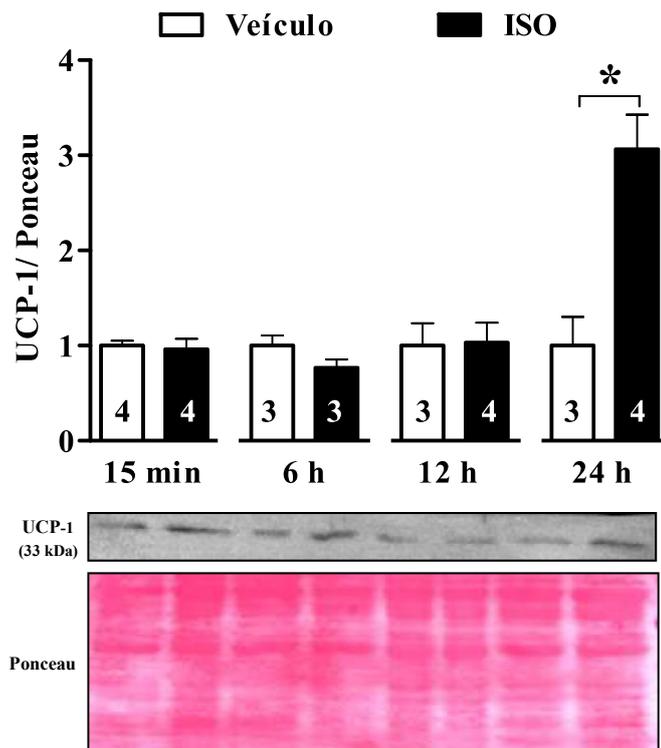
A expressão proteica das enzimas 11 $\beta$ -HSD1, CYP11B1, 11 $\beta$ -HSD2 e CYP11B2 e de UCP-1 foi avaliada frente à estimulação tempo-dependente com isoproterenol *in situ* no PVAT, a fim de avaliar se a estimulação prolongada *in situ* é equivalente ao tratamento *in vivo* quanto à modulação da expressão dessas proteínas.

O estímulo por 15 min e 6h não altera a expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1, enquanto que após 12h houve redução da expressão da enzima (Figura 13A) comparada ao veículo. A estimulação  $\beta$ -AR com isoproterenol prolongada por 24h aumentou a expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1 (Figura 13A). A expressão proteica da enzima CYP11B1 apresentou aumento com 15min de incubação com isoproterenol seguida de redução com 6h de incubação, não apresentando alteração com 12h e 24h de incubação em relação ao veículo (Figura 13B). Observamos redução da expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD2 com estimulação dos  $\beta$ -AR por 15 min, o que não foi mais observado para os tempos 6h, 12h e 24h, comparado ao veículo (Figura 13C). A expressão da enzima CYP11B2 não apresentou alteração entre as condições estudadas nos diferentes tempos avaliados (Figura 13D).

A estimulação  $\beta$ -AR com isoproterenol por 24h aumentou a expressão proteica de UCP-1, a qual não foi alterado pela estimulação por 15 min, 6h e 12h, comparada ao veículo (Figura 14).



**Figura 13.** Expressão proteica das enzimas 11β-HSD1 (A), CYP11B1 (B), 11β-HSD2 (C) e CYP11B2 (D) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica incubado com isoproterenol (1 μM) ou veículo por 15 min, 6h, 12h e 24h. A expressão da proteína foi normalizada pela coloração da membrana ao Ponceau. Dados estão expressos como média ± EPM. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Teste *t* de Student; \*P<0,05.

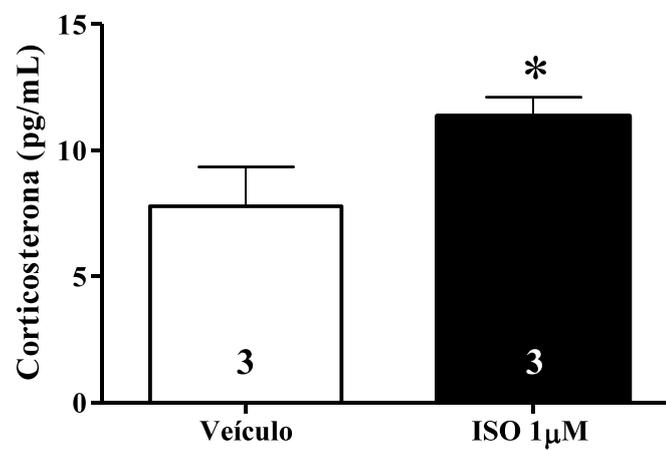


**Figura 14.** Expressão da proteína desacopladora tipo 1 (UCP-1) em tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica incubado *in situ* com isoproterenol (1  $\mu$ M) ou veículo por 15 min, 6h, 12h e 24h. A expressão da proteína foi normalizada pela coloração da membrana ao Ponceau. Dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. O número de animais (n) está expresso dentro das barras. Teste *t* de Student; \* $P < 0,05$ .

#### **4.10 Adipócitos do PVAT da aorta torácica secretam mais corticosterona em resposta à estimulação $\beta$ -adrenérgica**

O PVAT é composto por diferentes tipos celulares, incluindo adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune (Szasz et al., 2013). Para identificar se os adipócitos seriam os responsáveis pelo aumento de secreção de corticosterona em resposta à estimulação  $\beta$ -adrenérgica no PVAT, foi realizada cultura primária de adipócitos provenientes do PVAT aórtico na presença ou ausência do agonista  $\beta$ -AR isoproterenol.

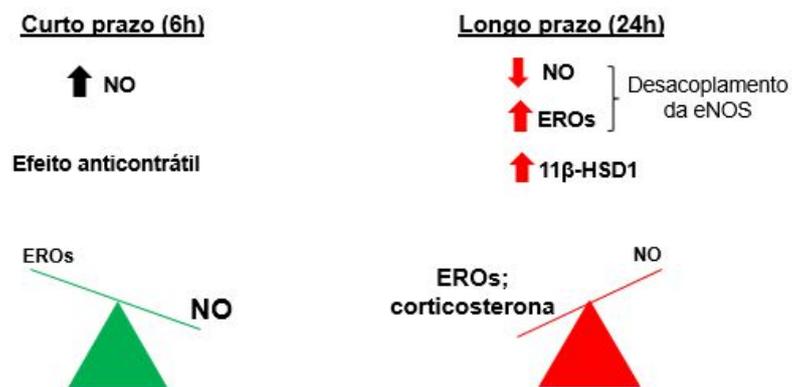
A incubação dos adipócitos com isoproterenol 1  $\mu$ M por 24 horas resultou no aumento de 56% na concentração de corticosterona avaliada no meio de cultura comparada ao veículo (Figura 15).



**Figura 15.** Concentração de corticosterona no meio de cultura primária de adipócitos provenientes do tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica incubados com isoproterenol (1  $\mu$ M) ou veículo por 24h. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  EPM (3 experimentos, sendo cada amostra referente a um pool de PVAT de 2 ratos). Teste *t* de Student; \* $P < 0,05$  vs. Veículo.

## 5 DISCUSSÃO

Apesar da ativação dos  $\beta$ -AR em depósitos lipídicos clássicos ter sido amplamente estudada nas últimas décadas, o papel da estimulação  $\beta$ -adrenérgica no PVAT e sua contribuição para a fisiologia vascular e para a fisiopatologia de doenças cardiovasculares são menos compreendidos. Neste estudo, primeiramente, abordamos o papel da estimulação crônica dos  $\beta$ -AR *in vivo* no PVAT aórtico via tratamento crônico com isoproterenol, e demonstramos: 1) perda do efeito anticontrátil do PVAT, 2) redução da biodisponibilidade de NO, 3) estresse oxidativo, 4) ativação da via  $\beta_2$ -AR/Src/ERK, 5) aumento de IL-6 e UCP-1, e 6) aumento de corticosterona tecidual com maior expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1. Para maior compreensão do papel dos  $\beta$ -AR no PVAT investigamos o efeito tempo-dependente da ativação dos  $\beta$ -AR *in situ* no PVAT, o qual revelou que a estimulação dos  $\beta$ -AR por curto prazo aumenta a produção de NO, enquanto que por períodos mais prologados aumenta a expressão da enzima 11 $\beta$ -HSD1, EROs via desacoplamento da eNOS e redução da biodisponibilidade de NO. O sumário dos resultados obtidos está esquematizado na Figura 16. Ademais demonstramos que a estimulação  $\beta$ -adrenérgica aumenta a secreção de corticosterona em cultura de adipócitos provenientes do PVAT. Em conjunto os dados revelam pela primeira vez o papel da estimulação dos  $\beta$ -AR no balanço redox e perfil secretório do PVAT, de maneira independente de fatores circulantes.



**Figura 16.** Esquema demonstrando os efeitos da ativação a curto (6h) e longo (24h) prazo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos no tecido adiposo perivascular (PVAT). NO: óxido nítrico; EROs: espécies reativas de oxigênio; eNOS: óxido nítrico sintase isoforma endotelial, 11 $\beta$ -HSD1: 11 $\beta$ -hidroxiesteróide dehidrogenase 1.

O modelo de hiperativação dos  $\beta$ -AR induzido pelo tratamento por 7 dias com isoproterenol 0,3 mg/kg/dia é um modelo estabelecido de hipertrofia cardíaca (Taylor & Tang, 1984). Como já descrito anteriormente pelo nosso grupo (Davel et al., 2006; 2015) e outros pesquisadores (Kim et al., 2012), nesse modelo experimental observa-se hipertrofia ventricular direita e esquerda, mas sem alteração significativa de parâmetros hemodinâmicos. Ademais nesse modelo, não observamos alterações significativas na glicemia de jejum e no conteúdo plasmático de triglicérides e colesterol total. Recentemente foi demonstrado que o tratamento com isoproterenol, mesmo por maior período (14 dias) e dose (1 mg/kg/dia), não altera os níveis glicêmicos de ratos (Ikeda et al., 2016).

O PVAT da aorta torácica apresenta características fenotípicas similares ao tecido adiposo subescapular (Padilla et al., 2013) sendo composto em sua maior parte por adipócitos multiloculares (Watts et al., 2011), e nossos dados vão ao encontro desses achados. Apesar da similaridade fenotípica entre o PVAT da aorta torácica e o tecido adiposo subescapular, estes tecidos não apresentam a mesma origem embrionária (Contreras et al., 2016). O PVAT da aorta torácica não expressa o gene *Zic1* (Contreras et al., 2016), recentemente validado como marcador de adipócitos em depósitos de tecido adiposo marrom (de Jong et al. 2015), mas sim maior transcrição do marcador adipogênico *Cebpa* do que o tecido adiposo subescapular, sendo a expressão do gene *Ucp1* similar entre os dois depósitos lipídicos (Contreras et al., 2016). Esses estudos ressaltam a importância de se estudar as alterações específicas no PVAT em resposta a diferentes estímulos e fatores de risco metabólico e cardiovascular, uma vez que os dados em depósitos de tecido adiposo clássicos podem não refletir o que acontece funcionalmente no PVAT.

Sabe-se de longa data que a hiperatividade simpática induzida pelo frio ou a administração crônica de agonistas de  $\beta$ -AR causam hiperplasia do tecido adiposo subescapular e aumentam a expressão da UCP-1, estimulando assim a termogênese (Tsukazaki et al., 1995). Estamos apresentando pela primeira vez que o tratamento crônico *in vivo* com agonista  $\beta$ -AR isoproterenol reduziu a deposição lipídica no PVAT da aorta torácica de ratos, o que também foi observado no tecido adiposo marrom supraespinal desses animais, mantendo-se a similaridade fenotípica entre ambos. Cabe ressaltar que não houve alteração do peso corporal ou da massa total de PVAT da aorta torácica e do tecido adiposo supraespinal entre os grupos estudados. A menor deposição lipídica no PVAT da aorta torácica do grupo isoproterenol foi associada a maior expressão proteica da UCP-1, o que

sugere um aumento da proporção de adipócitos termogênicos do tipo marrom e/ou bege (adipócitos do tipo branco que se diferenciam em marrom) neste tecido, demonstrando que o isoproterenol ativa o *browning* no PVAT aórtico. Recentemente foi descrito o processo de *browning* no PVAT de artéria mesentérica de animais tratados com o agonista  $\beta_3$ -AR CL 316,243 (1 mg/kg/dia) por 7 dias (Friederich-Persson et al., 2017). O PVAT desses animais apresentou maior expressão do gene UCP-1 e de genes específicos que determinam tecido adiposo bege, o TMEM-26, Tbx1 e CD137 (Friederich-Persson et al., 2017). Porém vale ressaltar que o processo de *browning* em doenças cardiovasculares pode não ser benéfico. Recentemente, foi demonstrado que o *browning* no tecido adiposo branco e o aumento dos depósitos de tecido adiposo marrom em camundongos com HFpEF não obesos resultou na dificuldade desses animais em manter o controle adequado da temperatura quando expostos ao frio, sugerindo disfunção do tecido adiposo subescapular (Valero-Muñoz et al., 2016). Ainda esses autores observaram maior infiltrado de neutrófilos no tecido adiposo epididimal, indicando que a ativação do *browning* pode ser inadequada na HFpEF, e assim contribuir para a patogênese da doença (Valero-Muñoz et al., 2016). Esses efeitos não foram associados a ativação da via clássica  $\beta_3$ -AR/PKA, sugerindo que os efeitos inadequados do *browning* em modelos experimentais que não estão associados a obesidade podem estar associados a ativação de outras vias de sinalização.

A descoberta que os receptores  $\beta_3$ -AR estão amplamente expressos no tecido adiposo marrom e branco (Emorine et al., 1989) e tem papel central no aumento da atividade da UCP-1 e redução dos depósitos de tecido adiposo branco (Himms-Hagen et al., 2000) justificam a maioria dos trabalhos que avaliam os efeitos da estimulação aguda e/ou crônica dos  $\beta_3$ -AR com uso do agonista seletivo CL 316,243 (Himms-Hagen et al., 2000; Ferrand et al., 2006). Apesar do subtipo  $\beta_3$ -AR ser o subtipo dos  $\beta$ -AR mais importante para ativação da UCP-1, os subtipos  $\beta_1$ -AR e  $\beta_2$ -AR também contribuem para este efeito no tecido adiposo marrom (Puigserver et al., 1996), sendo que o  $\beta_1$ -AR é essencial para termogênese induzida pelo frio ou pela dieta, uma vez que animais knockout (KO) para o  $\beta_1$ -AR ( $\beta_1$ -ARKO) desenvolvem hipotermia (Ueta et al., 2012).

A sinalização  $\beta$ -AR é classicamente associada ao aumento dos níveis de AMPc e ativação da PKA. Porém, sabe-se que o subtipo  $\beta_2$ -AR pode levar a ativação de vias alternativas, com ativação de Ras/Src/MAPKs (Daaka et al., 1997). Já foi demonstrado que a estimulação de adipócitos marrom com noradrenalina ou isoproterenol aumentam a atividade

da MAPK ERK1/2, por um mecanismo independente de AMPc/PKA (Valladares et al., 2000). No presente estudo, observamos um aumento da expressão de  $\beta_2$ -AR e da fosforilação de Src e de ERK1/2 no PVAT da aorta torácica em resposta ao tratamento *in vivo* por 7 dias com isoproterenol, sem alteração da expressão de  $\beta_3$ -AR e com *down-regulation* do  $\beta_1$ -AR e da subunidade catalítica da PKA. Esses dados sugerem ativação da via de sinalização  $\beta_2$ -AR/Src/ERK no PVAT da aorta torácica em resposta ao estímulo  $\beta$ -adrenérgico prolongado. Estes dados estão de acordo com o previamente publicado por nosso grupo de pesquisa (Davel *et al.*, 2014) e por outros (Perez-Aso *et al.*, 2014), em que a estimulação  $\beta_2$ -AR medeia a ativação da via Src/ERK nas células vasculares da aorta, e pela primeira vez indica um possível papel da sinalização  $\beta_2$ -AR no PVAT.

Uma característica da insuficiência cardíaca são as alterações moleculares da via de sinalização dos  $\beta$ -AR no coração, destacando-se a sinalização  $\beta_1$ -AR seguida por *down-regulation* e desacoplamento desses receptores da proteína Gs, com prejuízo da cascata de sinalização AMPc/PKA (Engelhardt et al., 1996; Triposkiadis et al., 2009), e assim, o uso de antagonistas seletivos para o  $\beta_1$ -AR tem conhecida relevância clínica no tratamento de pacientes com insuficiência cardíaca (Bristow, 2011). O papel dos  $\beta_2$ -AR e  $\beta_3$ -AR são menos esclarecidos na insuficiência cardíaca, porém, foi demonstrado que os níveis de  $\beta_2$ -AR na insuficiência cardíaca não estão alterados (Bristow et al., 1986). Ademais, enquanto que um aumento em 5 vezes da expressão de  $\beta_1$ -AR é capaz de causar uma cardiomiopatia, o mesmo efeito é alcançado apenas com uma superexpressão em torno 100-350 vezes dos  $\beta_2$ -AR (Engelhardt et al., 1999; Liggett et al., 2000), o que reflete a importância da sinalização  $\beta_1$ -AR no tecido cardíaco. Porém, em outros tecidos, a importância relativa dos subtipos  $\beta$ -AR em situações de hiperativação adrenérgica pode ser diferente do observado para o coração. Similar ao observado no tecido cardíaco, no presente estudo houve *down-regulation* de  $\beta_1$ -AR no PVAT induzida pela hiperestimulação adrenérgica. Entretanto, observou-se um aumento da expressão de  $\beta_2$ -AR no PVAT. Uma limitação do presente estudo é que não foi avaliado se o aumento da expressão do  $\beta_2$ -AR e/ou a redução de  $\beta_1$ -AR no PVAT é o mecanismo responsável pelas alterações induzidas pelo isoproterenol nesse depósito de tecido adiposo. Para tal esclarecimento, experimentos utilizando animais KO para  $\beta_1$ -AR e/ou  $\beta_2$ -AR ou o silenciamento destes receptores nos adipócitos do PVAT são necessários.

Estudos prévios demonstraram que o papel anticontrátil do PVAT em aorta torácica pode estar prejudicado em doenças cardiovasculares que cursam com hiperatividade

simpática como na síndrome metabólica (Marchesi et al., 2009) e na hipertensão arterial (Gálvez-Prieto et al., 2012). Desse modo, avaliamos se a hiperativação  $\beta$ -AR induzida pelo tratamento com isoproterenol *in vivo* modula a função anticontrátil do PVAT. Observamos que o tratamento crônico com isoproterenol resultou na perda do efeito anticontrátil do PVAT da aorta torácica, demonstrando que a ativação prolongada dos  $\beta$ -AR cursa com redução da liberação de fatores relaxantes ou aumento de fatores contráteis pelo PVAT. Por outro lado, o tratamento por 7 dias com o agonista  $\beta_3$ -AR CL 316,243 aumenta o efeito anticontrátil do PVAT de artéria mesentérica, com maior produção de peróxido de hidrogênio nesse tecido e ativação da PKG-1 $\alpha$  nas células de músculo liso vascular (Friederic-Persson et al., 2017). Sabe-se que a ativação dos  $\beta_3$ -AR em PVAT de artéria mesentérica está associada a liberação de adiponectina (Weston et al., 2013), de modo que, neste local, a hiperativação dos receptores  $\beta_3$ -AR pode levar a maior produção ADRF resultando assim na potencialização do efeito anticontrátil do PVAT. Cabe ressaltar que esses autores investigaram o PVAT da artéria mesentérica, tecido fenotipicamente e funcionalmente diferente do PVAT aórtico, e até onde sabemos, não há dados na literatura que avaliem a resposta anticontrátil do PVAT da aorta torácica de animais tratados cronicamente com agonistas dos  $\beta_3$ -AR ou submetidos ao frio. Assim, esses dados reforçam a necessidade de estudos da hiperativação  $\beta$ -adrenérgica nos diferentes depósitos de PVAT e possíveis interferências na função vascular.

Os adipócitos presentes no PVAT liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em situações patológicas (Szasz et al., 2013), e podem estar associados a disfunção vascular mediada pelo PVAT. A estimulação adrenérgica de adipócitos marrons com norepinefrina ou exposição ao frio resulta no aumento da expressão de IL-6 em adipócitos marrom e no tecido adiposo inguinal (Burýsek & Houstek, 1997; Knudsen et al., 2014). Em somatória, trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento *in vivo* com isoproterenol resultou no aumento da expressão gênica e proteica de IL-1 $\beta$  e IL-6 sem alteração de TNF- $\alpha$  em aorta de ratos (Davel et al., 2008). De maneira análoga, no presente estudo demonstramos que há aumento da expressão proteica da citocina IL-6, sem alteração de TNF- $\alpha$ , no PVAT aórtico de animais tratados com isoproterenol. A IL-6 tem sido descrita como fator importante para regulação da expressão de UCP-1, uma vez que esta citocina pode aumentar a expressão gênica de UCP-1 em tecido adiposo subcutâneo, e animais IL-6KO quando expostos ao frio apresentam redução da expressão proteica de UCP-1 (Knudsen et al., 2014). Em somatória, a incubação com TNF- $\alpha$  e IL-6, mas não com

IL-1 $\beta$ , resulta na perda do efeito anticontrátil do PVAT de artéria mesentérica, e esse efeito é revertido após incubação com anticorpos para inibição das citocinas ou com superóxido dismutase e catalase, sugerindo que a IL-6 pode contribuir para a disfunção do PVAT via produção de EROs (Greenstein et al., 2009). Assim, nossos dados sugerem que o aumento de IL-6 no PVAT de animais com hiperativação dos  $\beta$ -AR contribuem para um processo pró-inflamatório tecidual, e este pode ser um dos fatores associados ao efeito *browning*, estresse oxidativo e à redução do efeito anticontrátil do PVAT desses animais.

Sabe-se que ativação aguda dos  $\beta$ -AR estimula a produção de NO pela eNOS nas células endoteliais (Ferro et al., 1999; Queen et al., 2006), enquanto que a estimulação prolongada dos  $\beta$ -AR pode levar ao desacoplamento da eNOS no endotélio e assim contribuir para a menor biodisponibilidade do NO derivado do endotélio em doenças cardiovasculares (Davel et al., 2011; 2014; Victorio et al., 2016b). Recentemente foi descrito por nosso grupo de pesquisa e por outros autores que o PVAT da aorta torácica expressa eNOS e produz NO (Araujo et al., 2015; Xia et al., 2016; Victorio et al. 2016a). Porém, se a estimulação  $\beta$ -AR poderia modular a produção de NO pelo PVAT ainda não era conhecido. No presente estudo demonstramos pela primeira vez que a estimulação crônica dos receptores  $\beta$ -AR pode modular a produção/biodisponibilidade de NO também no PVAT. A observação *in situ* desta sinalização demonstrou que, a curto prazo, a estimulação com isoproterenol resulta em aumento da produção de NO, o que está de acordo com dados prévios que demonstram que a estimulação aguda dos  $\beta$ -AR está associada a liberação de NO em células endoteliais (Ferro et al., 1999; Queen et al., 2006) e outros ADRFs como adiponectina (Weston et al., 2013). Porém, de acordo com o observado *in vivo*, a incubação prolongada *in situ* com isoproterenol resulta em desacoplamento da eNOS, geração de estresse oxidativo e redução dos níveis de NO no PVAT, sugerindo um efeito direto da estimulação dos  $\beta$ -AR neste tecido. Esses dados revelam uma nova via de controle do tônus vascular exercida pelo PVAT em resposta a catecolaminas.

Estresse oxidativo associado à redução da produção e biodisponibilidade de NO é um dos principais fatores envolvidos no distúrbio da função vascular frente a diferentes doenças cardiovasculares. Neste cenário, destaca-se o papel do desacoplamento da eNOS como importante mecanismo envolvido na patogênese da doença vascular periférica (Li et al., 2014). No presente estudo avaliamos a produção de EROs sensível ao L-NAME (inibidor da NOS) no PVAT. Este método foi validado e tem sido utilizado para avaliar a produção de

EROs derivada da eNOS desacoplada (Antoniades et al., 2006; 2009). Observou-se aumento de ânion superóxido no PVAT do grupo tratado com isoproterenol tanto *in vivo* quanto *in situ* após estimulação por 24h dos  $\beta$ -AR quando comparado ao grupo controle, sendo que a incubação com L-NAME aboliu a diferença entre os grupos tanto *in vivo* quanto *in situ*. Em conjunto, esses dados sugerem que a eNOS encontra-se desacoplada no PVAT após tratamento crônico com isoproterenol, o que aumenta a produção de ânion superóxido neste tecido resultando na redução da produção e biodisponibilidade de NO, e esse mecanismo pode estar envolvido no aumento da contração à fenilefrina da aorta. Vale ressaltar, que o estresse oxidativo observado no PVAT em resposta à estimulação  $\beta$ -adrenérgica poderia ser gerado por outras fontes geradoras de EROs, como a NADPH oxidase (Nox). Dados prévios sugerem que não há envolvimento da Nox2 na geração de estresse oxidativo na aorta (Davel et al., 2014) ou no coração (Grune et al., 2018) de animais tratados com isoproterenol. Entretanto, esses dados são controversos, uma vez que outros autores sugerem que a hiperativação dos  $\beta$ -AR pode induzir estresse oxidativo via ativação do complexo da NADPH oxidase em ambos os tecidos (Cheng et al., 2009; Xu et al., 2008).

Recentemente, demonstramos que o aumento da contração à fenilefrina, desacoplamento da eNOS e produção de EROs em aorta torácica induzidos pelo tratamento crônico com isoproterenol são prevenidos pelo tratamento com espironolactona, um antagonista MR (Victorio et al., 2016b). Sabendo-se que adipócitos sintetizam e liberam fatores ativadores de MR (Briones et al., 2012), no presente estudo levantamos a hipótese de que a via de sinalização dos  $\beta$ -AR poderia estimular a produção de ligantes do MR no PVAT.

As enzimas CYP11B2 e CYP11B1, enzimas chaves para produção de aldosterona e corticosterona, respectivamente, principalmente encontradas em tecidos epiteliais, regulam a síntese sistêmica desses hormônios, enquanto que as enzimas 11 $\beta$ -HSD1 e 2 controlam a geração local desses hormônios. Em adipócitos, foi demonstrado que a enzima 11 $\beta$ -HSD1, a qual converte o metabólito inativo em corticosterona é regulado por citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) aumentando a expressão da enzima localmente e assim a concentração de corticosterona local (Tomlinson et al., 2001). No PVAT dos animais tratados *in vivo* com isoproterenol observamos aumento na expressão de IL-6 concomitante ao aumento da enzima 11 $\beta$ -HSD1 e dos níveis de corticosterona tecidual. Assim, é possível que uma *upregulation* de IL-6 contribua para a maior expressão de 11 $\beta$ -HSD1 no PVAT em resposta à hiperestimulação  $\beta$ -AR. Similar ao observado no estudo *in vivo*, a exposição ao isoproterenol

por 24h induz aumento da expressão de 11 $\beta$ -HSD1 no PVAT *in situ*, além de aumentar a secreção de corticosterona por adipócitos do PVAT aórtico em cultura. Esses dados sugerem que a incubação do PVAT com isoproterenol por 24h, maior tempo utilizado nos estudos *in situ* e *in vitro*, mimetiza os efeitos observados pelo tratamento *in vivo* com isoproterenol por 7 dias, sendo assim um ótimo modelo para estudo da sinalização  $\beta$ -AR tecidual prolongada. Os dados em cultura primária de adipócitos isolados do PVAT aórtico também sugerem que são essas células as responsáveis pela elevada secreção de corticosterona em resposta à estimulação  $\beta$ -AR no PVAT. A ativação da enzima 11 $\beta$ -HSD1 em adipócitos, além de poder contribuir para maior síntese e liberação de glicocorticoides, está associada à redução da síntese do ADRF adiponectina (Koh et al., 2015), o que também poderia contribuir para a perda do efeito anticontrátil observada no PVAT dos animais tratados com isoproterenol, em conjunto com a redução na biodisponibilidade do NO que foi demonstrada. Não podemos excluir que o aumento transitório de CYP11B1 concomitante com a redução de 11 $\beta$ -HSD2 causados após 15 min incubação *in situ* com isoproterenol no PVAT sejam mecanismos adicionais envolvidos no aumento da secreção de corticosterona.

Dados da literatura demonstram que a incubação de células endoteliais com cortisol resulta na redução da expressão da eNOS após 24h (Rogers et al., 2002), sugerindo que o aumento da liberação de glicocorticoides pode levar a redução da produção de NO, e esse desbalanço favorecer o desacoplamento da eNOS e produção de EROs nas células endoteliais. Além disso, alterações na atividade da 11 $\beta$ -HSD1 podem levar a descontrole metabólico, o que corrobora com a ação benéfica de inibidores da 11 $\beta$ -HSD1 na síndrome metabólica e desenvolvimento da aterosclerose (Hermanowski-Vosatka *et al.*, 2005). Em conjunto, os dados *in situ* revelam que enquanto a estimulação a curto prazo dos  $\beta$ -AR resulta na produção de NO, a estimulação prolongada desses receptores induz estresse oxidativo via desacoplamento da eNOS e provável aumento da liberação de corticosterona resultante da maior expressão de 11 $\beta$ -HSD1.

A corticosterona induz contração em aorta envolvendo a ativação da via Src/ERK1/2, e esses efeitos são mediados pela ativação do MR e bloqueados pelo L-NAME, sugerindo que os efeitos da corticosterona são endotélio-dependentes (Molnar et al., 2008). Interessantemente, nós demonstramos que o tratamento com o antagonista MR espirolactona previne a perda do efeito anticontrátil do PVAT induzida pelo tratamento crônico com isoproterenol (Victorio et al. 2016b). Uma vez que não houve alteração nos

níveis de aldosterona, mas sim aumento de corticosterona, os dados indicam que a corticosterona poderia ser o fator ligante do MR responsável pelos efeitos parácrinos do PVAT na aorta dos animais com hiperestimulação  $\beta$ -AR. Apesar dos efeitos vasculares induzidos pelo tratamento com isoproterenol *in vivo* terem sido abolidos pelo antagonista MR, não podemos excluir um possível efeito do aumento da secreção de corticosterona sobre o GR.

## 6 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados do presente estudo sugerem que a ativação crônica dos  $\beta$ -AR altera o estado redox e o perfil secretório do PVAT resultando em perda do efeito anticontrátil do PVAT e maior secreção de corticosterona por adipócitos deste tecido. A disfunção do PVAT induzido pela hiperativação  $\beta$ -AR foi associada com o aumento da geração de EROs, redução da biodisponibilidade de NO e maior expressão de IL-6 e de 11 $\beta$ -HSD1.

Assim, os presentes resultados estendem o conhecimento sobre a sinalização  $\beta$ -adrenérgica no PVAT da aorta torácica, com ênfase no seu papel fisiopatológico.

## 7 REFERÊNCIAS

Aghamohammadzadeh R, Withers S, Lynch F, Greenstein A, Malik R, Heagerty A. Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target. *British Journal of Pharmacology*. 165:670-682, 2012.

Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, Antonopoulos A, Warrick N, Van-Assche T, Cunningham C, Tousoulis D, Pillai R, Ratnatunga C, Stefanadis C, Channon KM. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. *European Heart Journal*. 30:1142–1150, 2009.

Antoniades C, Shirodaria C, Warrick N, Cai S, de Bono J, Lee J, Leeson P, Neubauer S, Ratnatunga C, Pillai R, Refsum H, Channon KM. 5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling. *Circulation*. 114:1193–1201, 2006.

Araujo HN, Valgas da Silva CP, Sponton AC, Clerici SP, Davel AP, Antunes E, Zanesco A, Delbin MA. Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. *Life Science*. 125:79-87, 2015.

Atkinson HC, Waddell BJ. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology*. 138:3842-3848, 1997.

Ayala-Lopez N, Thompson JM, Watts SW. Perivascular adipose tissue's impact on norepinephrine-induced contraction of mesenteric resistance arteries. *Frontiers in Physiology*. 8:38, 2017

Ayala-Lopez N, Watts SW. New actions of an old friend: perivascular adipose tissue's adrenergic mechanisms. *British Journal of Pharmacology*. 174(20):3454-3465, 2016.

Ayala-Lopez N, Jackson WF, Burnett R, Wilson JN, Thompson JM, Watts SW. Organic cation transporter 3 contributes to norepinephrine uptake into perivascular adipose tissue. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 309(11):H1904-1914, 2015.

Ayala-Lopez N, Martini M, Jackson WF, Darios E, Burnett R, Seitz B, Fink GD, Watts SW. Perivascular adipose tissue contains functional catecholamines. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2(3):e00041, 2014.

Banquet S, Delannoy E, Agouni A, Dessy C, Lacomme S, Hubert F, Richard V, Muller B, Leblais V. Role of G(i/o)-Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in  $\beta_2$ -adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. *Cellular Signaling*. 23(7):1136-1143, 2011.

Barrese V, Taglialatela M. New advances in beta-blocker therapy in heart failure. *Frontiers in Physiology*. 14(4):323, 2013.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 287:R943–R949, 2004.

Briones AM, Cat AND, Callera GE, Yogi A, Burger D, HE Y, Correa JW, Gagnon AM, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP, Sorisky A, Ooi TC, Ruzicka M, Burns KD, Touyz RM. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension*. 59(5):1069-78, 2012.

Bristow MR. Treatment of chronic heart failure with  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists: A convergence of receptor pharmacology and clinical cardiology. *Circulation Research*. 109:1176-1194, 2011.

Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, Zera P, Menlove R, Shah P, Jamieson S, Stinson EB.  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta_1$ -receptor downregulation in heart failure. *Circulation Research*. 59:297–309, 1986.

Bulloch JM, Daly CJ. Autonomic nerves and perivascular fat: interactive mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*. 143(1):61-73, 2014.

Burýsek L, Houstek J.  $\beta$ -adrenergic stimulation of interleukin- $\alpha$  and interleukin-6 expression in mouse brown adipocytes. *FEBS Letters*. 411:83-86, 1997.

Carnicer R, Crabtree MJ, Sivakumaran V, Casadei B, Kass DA. Nitric oxide synthases in heart failure. *Antioxidants & Redox Signaling*. 18(9):1078-1099, 2013.

Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK, Hein L. Differential distribution of  $\beta$ -Adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking  $\beta_1$ - or  $\beta_2$ -adrenergic receptors. *Molecular Pharmacology*. 60:955-962, 2001.

Contreras GA, Thelen K, Ayala-Lopez N, Watts SW. The distribution and adipogenic potential of perivascular adipose tissue adipocyte progenitors is dependent on sexual dimorphism and vessel location. *Physiological Reports*. 4(19):e12993, 2016.

Cheng Y, Dai D, Dai Y. Isoproterenol disperses distribution of NADPH oxidase, MMP-9, and pPKC $\epsilon$  in the heart, which are mitigated by endothelin receptor antagonist CPU0213. *Acta Pharmacologica Sinica*. 30:1099-11-6, 2009.

D'agostino DP, Putnam RW, Dean JB. Superoxide ( $*O_2^-$ ) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *Journal of Neurophysiology*. 98(2):1030-41, 2007.

Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*. 390:88-91, 1997.

Davel AP, Victorio JA, Delbin MA, Fukuda LE, Rossoni LV. Enhanced endothelium-dependent relaxation of rat pulmonary artery following  $\beta$ -adrenergic overstimulation: involvement of the NO/cGMP/VASP pathway. *Life Science*. 125:49-56, 2015.

Davel AP, Brum PC, Rossoni LV. Isoproterenol induces vascular oxidative stress and endothelial dysfunction via a  $G_i\alpha$ -coupled  $\beta_2$ -adrenoceptor signaling pathway. *PLoS ONE*. 9(3): e91877, 2014.

Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto GK, Oliveira HT, Rossoni LV. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44: 920-32, 2011.

Davel AP, Fukuda LE, Sa' LL, Munhoz CD, Scavone C, Sanz-Rosa D, Cachoeiro V, Lahera V, Rossoni LV. Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 295:H211–H219, 2008.

Davel AP, Kawamoto EM, Scavone C, Vassallo DV, Rossoni LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *British Journal of Pharmacology*. 148(5):629-639, 2006.

de Jong JM, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 308(12):E1085-E1105, 2015.

Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*. 245:1118-1121, 1989.

Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of sciences*. 96:7059-7064, 1999.

Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, Lohse MJ. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *Journal of America College of Cardiology*. 27:146–154, 1996.

Fang L, Zhao J, Chen Y, Ma T, Xu G, Tang C, Liu X, Geng B. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. *Journal of Hypertension*. 27:2174–2185, 2009.

Fernández-Alfonso MS, Somoza B, Tsvetkov D, Kuczmanski A, Dashwood M, Gil-Ortega M. Role of perivascular adipose tissue in health and disease. *Comprehensive Physiology*. 8:23-59, 2018.

Ferrand C, Redonnet A, Prévot D, Carpéne C, Atgié C. Prolonged treatment with the  $\beta$ 3-adrenergic agonist CL 316243 induces adipose tissue remodeling in rat but not in guinea pig: 1) fat store depletion and desensitization of  $\beta$ -adrenergic responses. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 62(2):89-100, 2006.

Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, Queen L. Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *British Journal of Pharmacology*. 143(3):397-403, 2004.

Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, Ward JP. Activation of nitric oxide synthase by beta 2-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *British Journal of Pharmacology*. 126(8):1872-1880, 1999.

Fésus G, Dubrovska G, Gorzelniak K, Kluge R, Huang Y, Luft FC, Gollasch M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovascular Research*. 75:719–727, 2007.

Fisher JP, Young CN, Fadel PJ. Central sympathetic overactivity: maladies and mechanisms. *Autonomic neuroscience: basic and clinical*. 148:5-15, 2009.

Flacco N, Segura V, Perez-Aso M, Estrada S, Seller JF, Jiménez-Altayó F, Noguera MA, D'Ocon P, Vila E, Ivorra MD. Different  $\beta$ -adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *British Journal of Pharmacology*. 169:413-25, 2013.

Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33:829-837, 2012.

Franco NS, Lubaczeuski C, Guizoni DM, Victorio JA, Santos-Silva JC, Brum PC, Carneiro EM, Davel AP. Propranolol treatment lowers blood pressure, reduces vascular inflammatory markers and improves endothelial function in obese mice. *Pharmacological Research*. 122:35-45, 2017.

Friederich-Persson M, Cat AND, Persson P, Montezano AC, Touyz RM. Brown adipose tissue regulates small artery function through NADPH oxidase 4-derived hydrogen peroxide and redox-sensitive protein kinase G-1 $\alpha$ . *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 37(3):455-465, 2017.

Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Ricquier D, Guerrieri M, Cinti S. White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma. *Biochimica et Biophysica Acta*. 183:950-9, 2013.

Fuller PJ, Yao Y, Yang J, Young MJ. Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *Journal of Endocrinology*. 213:15-24, 2012.

Funder JW. Mineralocorticoid receptor activation and oxidative stress. *Hypertension*. 50(2):840-1, 2007.

Galitzky J, Carpéné C, Bousquet-Mélou A, Berlan M, Lafontan M. Differential activation of  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$ -adrenoceptors by catecholamines in white and brown adipocytes. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 9:324-31, 1995.

Gálvez-Prieto B, Somoza B, Gil-Ortega M, García-Prieto CF, Heras A, González MC, Arribas S, Aranguez I, Bolbrinker J, Kreutz R, Ruiz-Gayo M, Fernández-Alfonso MS. Anticontractile effect of perivascular adipose tissue and leptin are reduced in hypertension. *Frontiers in Pharmacology*. 3:103, 2012.

Gao Y-J. Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction. *Current Pharmaceutical Design*. 13:2185-2192, 2007.

Gao Y-J, Holloway AC, Zeng ZH, Lim GE, Petrik JJ, Foster WG, Lee RM. Prenatal exposure to nicotine causes postnatal obesity and altered perivascular adipose tissue function. *Obesity Research*. 13:687-92, 2005a.

Gao Y-J, Zeng Z, Teoh K, Sharma AM, Abouzahr L, Cybulsky I, Lamy A, Semelhago L, Lee RM. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 130:1130-1136, 2005b.

Gong R, Morris DJ, Brem AS. Variable expression of 11beta Hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) isoforms in vascular endothelial cells. *Steroids*. 73:1187-96, 2008.

Graham LN, Smith PA, Huggett RJ, Stoker JB, Mackintosh AF, Mary DA. Sympathetic drive in anterior and inferior uncomplicated acute myocardial infarction. *Circulation*. 109:2285–2289, 2004.

Granneman JG, Li P, Zhu Z, Lu Y. Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of  $\beta_3$ -adrenergic receptor activation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 289:E608-16, 2005.

Granneman, JG. The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *American Journal Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 280, E199–E202, 2001.

Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, Scopelliti F, Dell'Oro R, Bolla G, Mancia G. Excessive sympathetic activation in heart failure with obesity and metabolic syndrome: characteristics and mechanisms. *Hypertension*. 49:535–541, 2007.

Grassi G. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *Journal of Hypertension*. 16:1979-1987, 1998.

Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, Yates AP, Pemberton PW, Malik RA, Heagerty AM. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation*. 119:1661-1670, 2009.

Grune J, Beyhoff N, Smeir E, Chudek R, Blumrich A, Ban Z, Brix S, Betz IR, Schupp M, Foryst-Ludwig A, Klopfleisch R, Stawowy P, Houtman R, Kolkhof P, Kintscher U. Selective mineralocorticoid receptor cofactor modulation as molecular basis for finerenone's antifibrotic activity. *Hypertension*. 71, 2018.

Gu P, Xu A. Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 14(1):49-58, 2013.

Hasking GJ, Esler MD, Jennings GL, Burton D, Korner PI. Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity. *Circulation*. 73(4):615-621, 1986.

Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology. Cellular Physiology*. 279:C670–81, 2000.

Hermanowski-Vosatka A, Balkovec JM, Cheng K, Chen HY, Hernandez M, Koo GC, Le Grand CB, Li Z, Metzger JM, Mundt SS, Noonan H, Nunes CN, Olson SH, Pikounis B, Ren N, Robertson N, Schaeffer JM, Shah K, Springer MS, Strack AM, Strowski M, Wu K, Wu T, Xiao J, Zhang BB, Wright SD, Thieringer R. 11 $\beta$ -HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 202:517–527, 2005.

Hori Y, Touei D, Saitoh R, Yamagishi M, Kanai K, Hoshi F, Itoh N. The Aldosterone receptor antagonist eplerenone inhibits isoproterenol-induced collagen-I and 11 $\beta$ -HSD1 expression in rat cardiac fibroblasts and the left ventricle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 40(10):1716-1723, 2017.

Ikeda J, Kimoto N, Kitayama T, Kunori S. Cardiac DPP-4 inhibition by saxagliptin ameliorates isoproterenol-induced myocardial remodeling and cardiac diastolic dysfunction in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 132:65-70, 2016.

Kietadisorn R, Juni RP, Moens AL. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 302:E481-E495, 2012.

Kim HK, Park WS, Warda M, Park SY, Ko EA, Kim MH, Jeong SH, Heo HJ, Choi TH, Hwang YW, Lee S, Kyung SK, Rhee BD, Kim N, Han J. Beta-adrenergic overstimulation impaired vascular contractility via actin-cytoskeleton disorganization in rabbit cerebral artery. *PLoS ONE*. 7(8):e43884, 2012.

Kim N, Kim H, Youm JB, Park WS, Warda M, Ko JH, Han J. Site specific differential activation of Ras/Raf/ERK signaling in rabbit isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763:1067-75, 2006.

Koh EH, Kim A, Kim H, Kim JH, Park H-S, Ko MS, Kim MO, Kim HJ, Kim BJ, Yoo HJ, Kim SJ, Oh JS, Woo CY, Jang JE, Leem J, Cho MH, Lee KU. 11 $\beta$ -HSD1 reduces metabolic efficacy and adiponectin synthesis in hypertrophic adipocytes. *Journal of Endocrinology*. 22:147-158, 2015.

Komai AM, Musovic S, Peris E, Alrifaiy A, El Hachmane MF, Johansson M, Asterholm IW, Olofsson CS. White adipocyte adiponectin exocytosis is stimulated via  $\beta$ 3-adrenergic signaling and activation of Epac1: catecholamine resistance in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 65:3301-3313, 2016.

Knudsen JG, Murholm M, Carey AL, Biensø RS, Basse AL, Allen TL, Hidalgo J, Kingwell BA, Febbraio MA, Hansen JB, Pilegaard H. Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCP1 expression in subcutaneous white adipose tissue. *PLoS ONE* 9(1):e84910, 2014.

Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Science*. 6(21):2241-2249, 1967.

Lean ME, James WP, Jennings G, Trayhurn P. Brown adipose tissue in patients with pheochromocytoma. *International Journal of Obesity*. 10:219–227, 1986.

Lee RM, Lu C, Su LY, Gao YJ. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *Journal of Hypertension*. 27:782-90, 2009a.

Lee RM, Ding L, Lu C, Su LY, Gao YJ. Alteration of perivascular adipose tissue function in angiotensin II-induced hypertension. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 87:944-953, 2009b.

Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Bégueret H, Bellance N, Banquet S, Allières C, Leroux L, Desgranges C, Gadeau A, Muller B.  $\beta$ -adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent  $\beta$ <sub>2</sub> component in pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research*. 77(1):202–210, 2008.

Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nature Medicine*. 13(2):189-197, 2007.

Levin BE, Sullivan AC.  $\beta$ 1-receptor is the predominant beta-adrenoreceptor on rat brown adipose tissue. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 236:681-8, 1986.

Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 237:208-19, 2014.

Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, Yatani A, Dorn GW. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation*. 101(14):1707-1714, 2000.

Liu Y, Mladinov D, Pietrusz JL, Usa K, Liang M. Glucocorticoid response elements and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Cardiovascular Research*. 81:140-147, 2009.

Lohn M, Dubrovská G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB Journal*. 16:1057-63, 2002.

Lu C, Su LY, Lee RM, Gao YJ. Alterations in perivascular adipose tissue structure and function in hypertension. *European Journal of Pharmacology*. 656:68-73, 2011.

Lu H, Boustany-Kari CM, Daugherty A, Cassis LA. Angiotensin II increases adipose angiotensinogen expression. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 292:E1280-E1287, 2007.

Manolis AJ, Poulimenos LE, Kallistratos MS, Gavras I, Gavras H. Sympathetic overactivity in hypertension and cardiovascular disease. *Current Vascular Pharmacology*. 12:4-15, 2014.

Marchesi C, Ebrahimian T, Ângulo O, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension*. 54:1384-92, 2009.

Molnar GA, Lindschau C, Dubrovská G, Mertens PR, Kirsch T, Quinkler M, Gollasch M, Wresche S, Luft FC, Müller DN, Fiebeler A. Glucocorticoid-related signaling effects in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 51:1372-8, 2008.

Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Li H, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and

function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circulation Research*. 90:e58-e65, 2002.

Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 304(7):R543-52, 2013.

Payne GA, Borbouse L, Kumar S, Neeb Z, Alloosh M, Sturek M, Tune JD. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-beta pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 30:1711-7, 2010.

Perez-Aso M, Flacco N, Carpena N, Montesinos MC, D'Ocon P, Ivorra MD.  $\beta$ -Adrenoceptors differentially regulate vascular tone and angiogenesis of rat aorta via ERK1/2 and p38. *Vascular Pharmacology*. 61:80-9, 2014.

Petruzzelli M, Schweiger M, Schreiber R, Campos-Olivas R, Tsoli M, Allen J, Swarbrick M, Rose-John S, Rincon M, Robertson G, Zechner R, Wagner EF. A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cellular Metabolism*. 20:433-447, 2014.

Pourageaud F, Leblais V, Bellance N, Marthan R, Muller B. Role of  $\beta_2$ -adrenoceptors ( $\beta$ -AR), but not  $\beta_1$ -,  $\beta_3$ -AR and endothelial nitric oxide, in  $\beta$ -AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 372(1):14-23, 2005.

Puigserver P, Picó C, Stock MJ, Palou A. Effect of selective  $\beta$ -adrenoceptor stimulation on UCP synthesis in primary cultures of brown adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*. 117:7-16, 1996.

Queen LR, Ferro A.  $\beta$ -Adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cellular and Molecular Life Science*. 63:1070-83, 2006.

Ribeiro ALP, Duncan BB, Brant LCC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular health in Brazil: Trends and perspectives. *Circulation*. 133:422-433, 2016.

Rodríguez-Crespo I, Gerber NC, Ortiz de Montellano PR. Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *Journal of Biological Chemistry*. 271:11462-7, 1996.

Rogers KM, Bonar CA, Estrella JL, Yang S. Inhibitory effect of glucocorticoid on coronary artery endothelial function. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 283:H1922-H1928, 2002.

Rossoni LV, Xavier FE, Moreira CM, Falcochio D, Amanso AM, Tanoue CU, Carvalho CR, Vassalo DV. Ouabain-induced hypertension enhances left ventricular contractility in rats. *Life Science.* 79:1537-1545, 2006.

Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 108:560-565, 2003.

Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clinical and Experimental Hypertension.* A13(2):277-296, 1991.

Szasz T, Bomfim GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue in vascular homeostasis. *Vascular Health and Risk Management.* 9:105-116, 2013.

Tan S, Curtis-Prior PB. Characterization of the beta-adrenoceptor of the adipose cell of the rat. *International Journal of Obesity.* 7(5):409-414, 1983.

Tanaka Y, Horinouchi T, Koike K. New insights into  $\beta$ -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 32:503-14, 2005.

Taylor PB, Tang Q. Development of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 62(4):384-389, 1984.

Than A, Ye F, Xue R, Ong JW, Poh CL, Chen P. The crosstalks between adipokines and catecholamines. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 332:261-270, 2011.

Tomlinson JW, Moore J, Cooper MS, Bujalska I, Shahmanesh M, Burt C, Strain A, Hewison M, Stewart PM. Regulation of expression of  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines. *Endocrinology.* 142:1982-1989, 2001.

Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure: Physiology, pathophysiology and clinical implications. *Journal of the American College of Cardiology.* 54:1747-1762, 2009.

Tsukazaki K, Nikami H, Shimizu Y, Kawada T, Yoshida T, Saito M. Chronic administration of beta-adrenergic agonists can mimic the stimulative effect of cold exposure on protein synthesis in rat brown adipose tissue. *Journal of Biochemistry.* 117:96-100, 1995.

Ueta CB, Fernandes GW, Capelo L, Fonseca TL, Maculan FD, Gouveia C, Brum PC, Christoffolete MA, Aoki MS, Lancelloti CL, et al.  $\beta$ 1 adrenergic receptor is key to cold- and diet-induced thermogenesis in mice. *Journal of Endocrinology*. 214:359–365, 2012.

Valladares A, Porras A, Álvarez AM, Roncero C, Benito M. Noradrenaline induces brown adipocytes cell growth via  $\beta$ -receptors by a mechanism dependent on ERKs but independent of cAMP and PKA. *Journal of Cellular Physiology*. 185:324-330, 2000.

Valero-Muñoz M, Li S, Wilson RM, Hulsmans M, Aprahamian T, Fuster JJ, Nahrendorf M, Scherer PE, Sam F. Heart failure with preserved ejection fraction induces beiging in adipose tissue. *Circulation. Heart Failure*. 9: e002724, 2016.

Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SWS. Thirty years of saying NO: Sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator. *Circulation Research*. 119:375-396, 2016.

Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang S, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*. 44:271-276, 2004.

Victorio JA, Fontes MT, Rossoni LV, Davel AP. Different anti-contractile function and nitric oxide production of thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Frontiers in Physiology*. 7:295, 2016a.

Victorio JA, Clerici SP, Palacios R, Alonso MJ, Vassallo DV, Jaffe IZ, Rossoni LV, Davel AP. Spironolactone prevent eNOS uncoupling and vascular dysfunction induced by  $\beta$ -adrenergic overstimulation: role of perivascular adipose tissue. *Hypertension*. 68(3):726-735, 2016b.

Vidal M, Wieland T, Lohse MJ, Lorenz K.  $\beta$ -Adrenergic receptor stimulation causes cardiac hypertrophy via a  $G\beta\gamma$ /ERK-dependent pathway. *Cardiovascular Research*. 96:255-64, 2012.

Watson AMD, Hood SG, May CN. Mechanisms of sympathetic activation in heart failure. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. 33:1269-1274, 2006.

Watts SW, Shaw S, Burnett R, Dorrance AM. Indoleamine 2,3-dioxygenase in periaortic fat: mechanisms of inhibition of contraction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 301:H1236-47, 2011.

Weston AH, Egner I, Dong Y, Porter EL, Heagerty AM, Edwards G. Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose

tissue: involvement of myocyte BKCa channels and adiponectin. *British Journal of Pharmacology*. 169:1500-1509, 2013.

Xia N, Horke S, Habermeier A, Closs EI, Reifenberg G, Gericke A, Mikhed Y, Münzel T, Daiber A, Förstermann U, Li H. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in perivascular adipose tissue of diet-induced obese mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 36, 2016.

Xu J, Li N, Dai DZ, Yu F, Dai Y. The endothelin receptor antagonist CPU0213 is more effective than aminoguanidine to attenuate isoproterenol-induced vascular abnormality by suppressing overexpression of NADPH oxidase, ETA, ETB, and MMP9 in the vasculature. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 52:42-8, 2008.

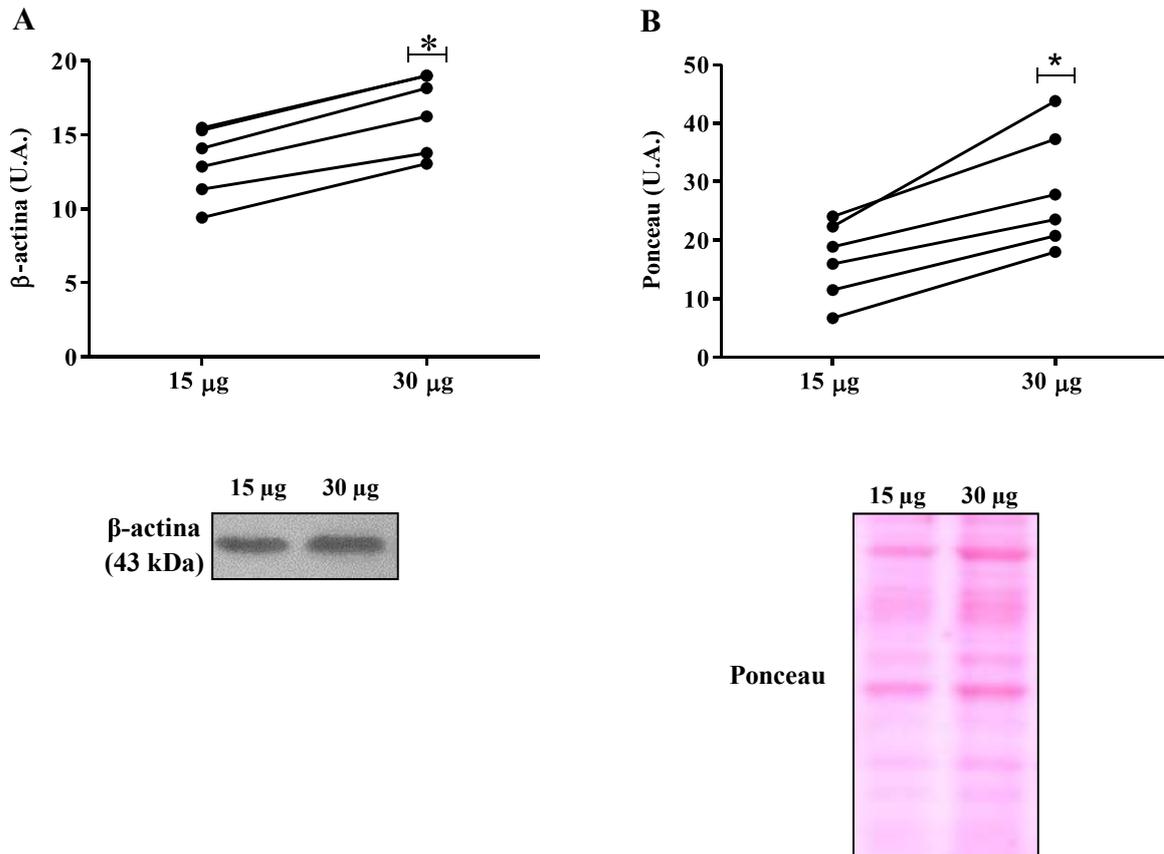
Yang S, Mulder H, Holm C, Edén S. Effects of growth hormone on the function of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in rat adipocytes. *Obesity Research*. 12:330–9, 2004.

Zhang F, Hao G, Shao M, Nham K, An Y, Wang Q, Zhu Y, Kusminski CM, Hassan G, Gupta RK, Zhai Q, Sun X, Scherer PE, Oz OK. An adipose tissue atlas: an image-guided identification of human-like BAT and beige depots in rodents. *Cell Metabolism*. 27:252-262, 2018.

Zou MH, Shi C, Cohen RA. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *Journal of Clinical Investigation*. 109:817-26, 2002.

## 8 ANEXO

ANEXO A – Validação da utilização da expressão da  $\beta$ -actina e coloração ao Ponceau como controles internos para carregamento de proteínas para western-blot.



**Figura Anexo A.** Análise quantitativa (painel superior) e imagens representativas (painel inferior) da expressão proteica de  $\beta$ -actina (A) e coloração ao Ponceau (B) de adipócitos de PVAT aórtico de ratos para diferentes concentrações de proteína (15  $\mu$ g e 30  $\mu$ g). Dados expressos como média  $\pm$  EPM. Teste *t* de Student: \*  $P < 0,05$  vs. 15  $\mu$ g.

# Renin–Angiotensin System

OPEN

## Spironolactone Prevents Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Vascular Dysfunction Induced by $\beta$ -Adrenergic Overstimulation Role of Perivascular Adipose Tissue

Jamaira A. Victorio, Stefano P. Clerici, Roberto Palacios, María J. Alonso, Dalton V. Vassallo, Iris Z. Jaffe, Luciana V. Rossoni, Ana P. Davel

**Abstract**—Sustained stimulation of  $\beta$ -adrenoceptors ( $\beta$ -ARs) and activation of renin–angiotensin–aldosterone system are common features of cardiovascular diseases with rising sympathetic activation, including essential hypertension, myocardial infarction, and heart failure. In this study, we investigated the role of AT1 receptor and mineralocorticoid receptor (MR) in the vascular alterations caused by  $\beta$ -AR overstimulation.  $\beta$ -AR overstimulation with associated cardiac hypertrophy and increased vasoconstrictor response to phenylephrine in aorta were modeled in rats by 7-day isoproterenol treatment. The increased vasoconstrictor response to phenylephrine in this model was blunted by the MR antagonist spironolactone, but not by the AT1 receptor antagonist losartan, despite the blunting of cardiac hypertrophy with both drugs. Spironolactone, but not losartan, restored NO bioavailability in association with lower endothelial nitric oxide synthase–derived superoxide production, increased endothelial nitric oxide synthase dimerization, and aortic HSP90 upregulation. MR genomic and nongenomic functions were activated in aortas from isoproterenol-treated rats. Isoproterenol did not modify plasma levels of MR ligands aldosterone and corticosterone but rather increased perivascular adipose tissue–derived corticosterone in association with increased expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. The anticontractile effect of aortic perivascular adipose tissue was impaired by  $\beta$ -AR overstimulation and restored by MR blockade. These results suggest that activation of vascular MR signaling contributes to the vascular dysfunction induced by  $\beta$ -AR overstimulation associated with endothelial nitric oxide synthase uncoupling. These findings reveal an additional explanation for the protective effects of MR antagonists in cardiovascular disorders with sympathetic activation. (*Hypertension*. 2016;68:726–735. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07911.) • [Online Data Supplement](#)

**Key Words:** adipose tissue ■ aorta ■ beta-adrenergic receptors ■ endothelial nitric oxide synthase ■ losartan ■ mineralocorticoid receptor

Sympathetic overactivity with rising catecholamines levels and adrenergic receptors stimulation is a common feature of many cardiovascular disorders, including hypertension, myocardial infarction (MI), congestive heart failure, and acute cerebrovascular events. In these conditions, the hyperadrenergic state has a major and independent prognostic impact.<sup>1</sup> Although the importance of  $\beta$ -adrenoceptor ( $\beta$ -AR) overstimulation in the pathogenesis of left ventricular dysfunction has been widely studied, less is known about its effects on vascular function. Following in vivo  $\beta$ -AR overstimulation, we and others have demonstrated abnormal vasoconstrictor response to agonists in aorta,<sup>2</sup> coronary artery,<sup>3</sup> and cerebral artery.<sup>4</sup> In

thoracic aorta, increased vasoconstrictor response induced by isoproterenol treatment was associated with increased reactive oxygen species generation and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase (eNOS).<sup>2,5</sup> These studies demonstrate that  $\beta$ -AR overstimulation induces vascular dysfunction but the molecular mechanisms remain to be elucidated.

Activation of the renin–angiotensin–aldosterone system is also involved in the pathogenesis of cardiovascular and metabolic diseases, including hypertension, MI, heart failure, and obesity. It is known that  $\beta$ -AR signaling in juxtaglomerular cells stimulates renin release, thereby stimulating renin–angiotensin–aldosterone system. In addition,  $\beta$ -AR agonist

Received June 6, 2016; first decision June 10, 2016; revision accepted June 17, 2016.

From the Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Brazil (J.A.V., S.P.C., A.P.D.); Department of Ciencias Básicas de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain (R.P., M.J.A.); Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil (D.V.V.); Molecular Cardiology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, MA (I.Z.J.); and Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil (L.V.R.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07911/-DC1>.

Correspondence to Ana P. Davel, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, PO Box 6109, University of Campinas-UNICAMP, 13083–865, Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail [anadavel@unicamp.br](mailto:anadavel@unicamp.br)

© 2016 The Authors. *Hypertension* is published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wolters Kluwer. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs](#) License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited, the use is noncommercial, and no modifications or adaptations are made.

*Hypertension* is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07911

isoproterenol increases cardiac expression of angiotensin-converting enzyme<sup>6</sup> and antagonism or deficiency of AT1 receptor (AT1R) attenuate isoproterenol-induced cardiac remodeling in mice.<sup>7</sup> Elevated circulating aldosterone is also associated with isoproterenol-induced heart failure,<sup>8</sup> and blockade of aldosterone-binding mineralocorticoid receptor (MR) is protective from cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction induced by chronic isoproterenol treatment in rats.<sup>9</sup> Together, these studies have suggested beneficial cardiac effects of AT1R and MR blockade in preventing isoproterenol-induced cardiac remodeling and dysfunction. In the vasculature, either AT1R or MR activation induces proinflammatory, profibrotic, and pro-oxidative vascular signaling pathways.<sup>10,11</sup> However, whether AT1R and MR contribute to the vascular abnormalities caused by  $\beta$ -AR overstimulation has not been explored.

Vascular function is also known to be modified by perivascular adipose tissue (PVAT). Angiotensin II, via AT1R promotes aldosterone secretion from adipocytes, acting in a paracrine manner to regulate vascular function and contributing to endothelial dysfunction in obesity.<sup>12</sup> PVAT of the thoracic aorta also releases adipocyte-derived relaxing factors that exhibit anticontractile effects.<sup>13,14</sup> Acute  $\beta$ -AR activation stimulates the release of adipocyte-derived relaxing factors from PVAT of mesenteric artery.<sup>15</sup> However, it is not known whether  $\beta$ -AR overstimulation could regulate the anticontractile effects of PVAT.

Therefore, in this study, we investigated a possible role of AT1R, MR, and PVAT in the vascular dysfunction induced by in vivo administration of isoproterenol as measured by enhanced vasoconstriction to phenylephrine. We hypothesized that MR activation induces uncoupling of eNOS, oxidative stress, and reduces anticontractile role of PVAT after  $\beta$ -AR overstimulation.

## Methods

### Animals

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Campinas (protocol no. 2609-1) and carried out in accordance with the ethical principles for animal experimentation adopted by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL/COBEA).

Male Wistar rats (12-week old) were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Research of the University

of Campinas (Campinas, Brazil). Animals were housed at a constant room temperature (22°C), 12:12 hour light:dark cycle, and with normal chow and water provided ad libitum. Isoproterenol (0.3 mg/kg per day, sc) or the vehicle were administered once daily for 7 days, concomitantly with the treatment or not via oral gavage with the AT1R antagonist losartan (40 mg/kg per day), or with the MR antagonist spironolactone (200 mg/kg per day).

### Vascular Reactivity, Blood Pressure, and Biochemical and Molecular parameters

Detailed methods are available in the [only-online Data Supplement](#).

### Statistical Analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM. Data were analyzed by the Student *t* test or two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test by using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Corp, San Diego, CA). Values of  $P < 0.05$  were considered significantly different.

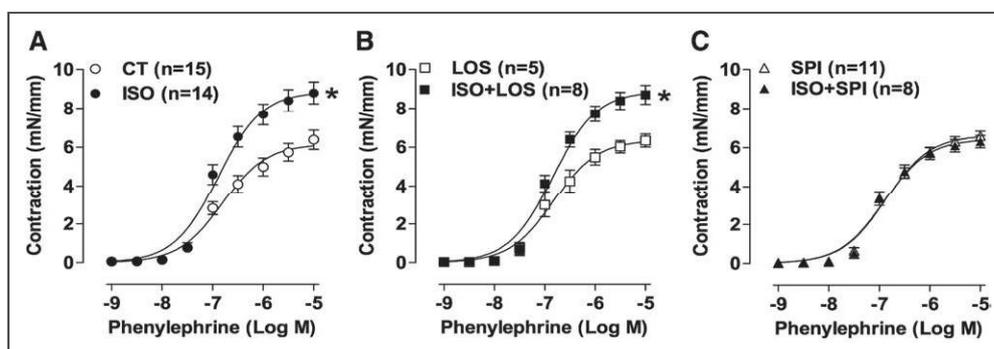
## Results

### Losartan and Spironolactone Treatments Similarly Reduce Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy

To confirm the efficacy of isoproterenol treatment in inducing long-term  $\beta$ -AR stimulation, the ventricular weight:body weight ratio was measured as an index of myocardial hypertrophy. Isoproterenol treatment increased ventricular weight:body weight ratio without affecting body weight that was similarly reduced by losartan and spironolactone (Table S1). No effect of either isoproterenol or spironolactone on blood pressure or heart rate was observed, but losartan decreased diastolic blood pressure in both control and isoproterenol-treated rats (Table S1).

### Spironolactone, but Not Losartan, Prevented the Increased Aortic Reactivity to Phenylephrine in Isoproterenol-Treated Rats

Aortic rings from isoproterenol-treated rats showed an increased contractile response to phenylephrine compared with the control group (Figure 1A). This high contractility was not altered by cotreatment with losartan (Figure 1B), whereas it was fully prevented by spironolactone cotreatment (Figure 1C). These data support a role for MR, but not the AT1R, in the increased aortic contractile response induced by  $\beta$ -AR overstimulation. The relaxation to either acetylcholine



**Figure 1.** Spironolactone, but not losartan, prevented the enhanced contraction to phenylephrine induced by  $\beta$ -adrenergic overstimulation. Concentration–response curves to phenylephrine obtained in aortic rings from rats treated with vehicle (CT) or isoproterenol (ISO; **A**) combined with losartan (LOS; **B**) or with spironolactone (SPI; **C**). Data are expressed as mean $\pm$ SEM; number of animals is indicated in parenthesis. Two-way ANOVA: \* $P < 0.001$  vs CT or LOS.

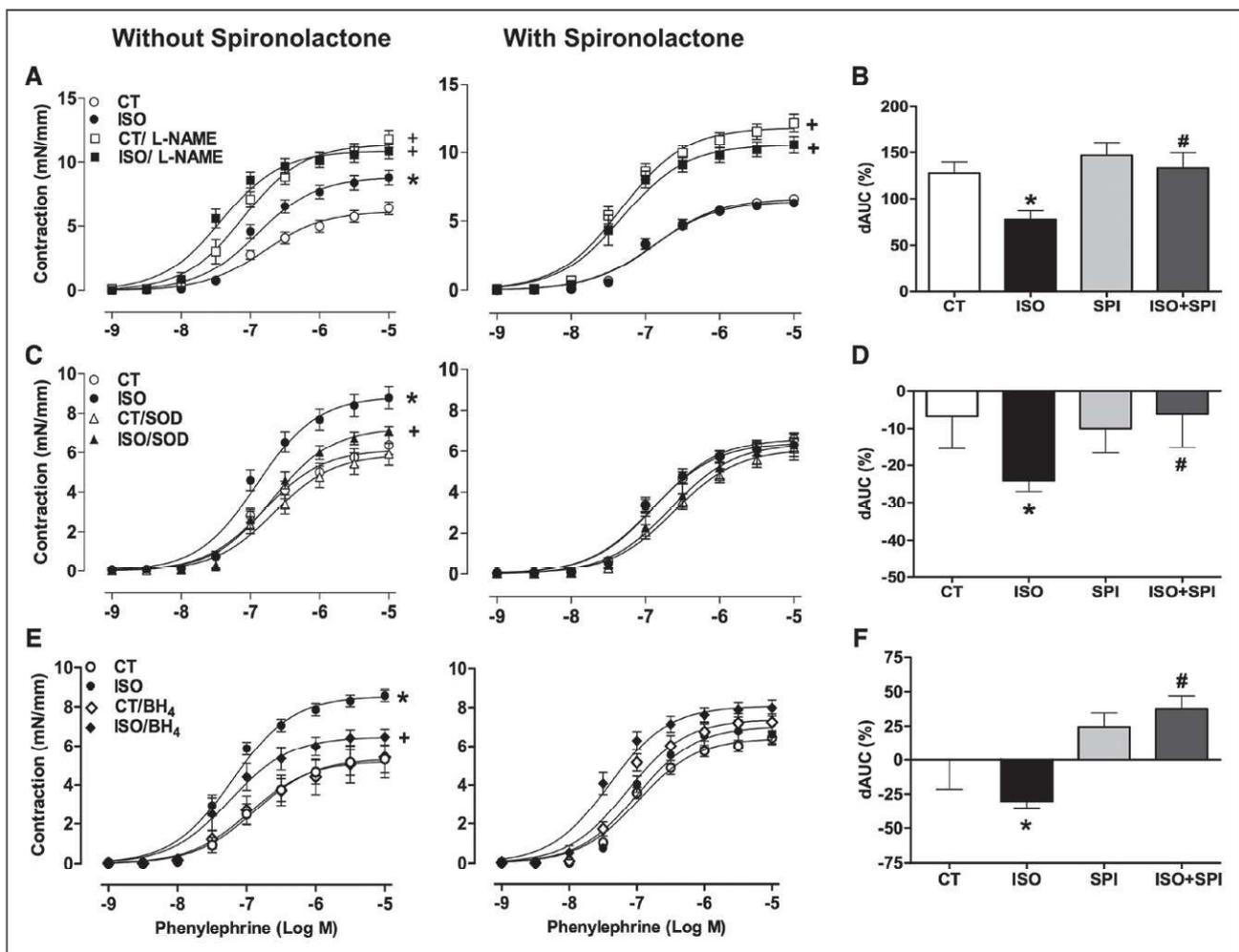
or sodium nitroprusside was not modified by the treatments (Figure S1).

### MR Antagonist Restored NO Bioavailability, NOS Dimerization, and HSP90 Protein Levels in Aortas of Isoproterenol-Treated Rats

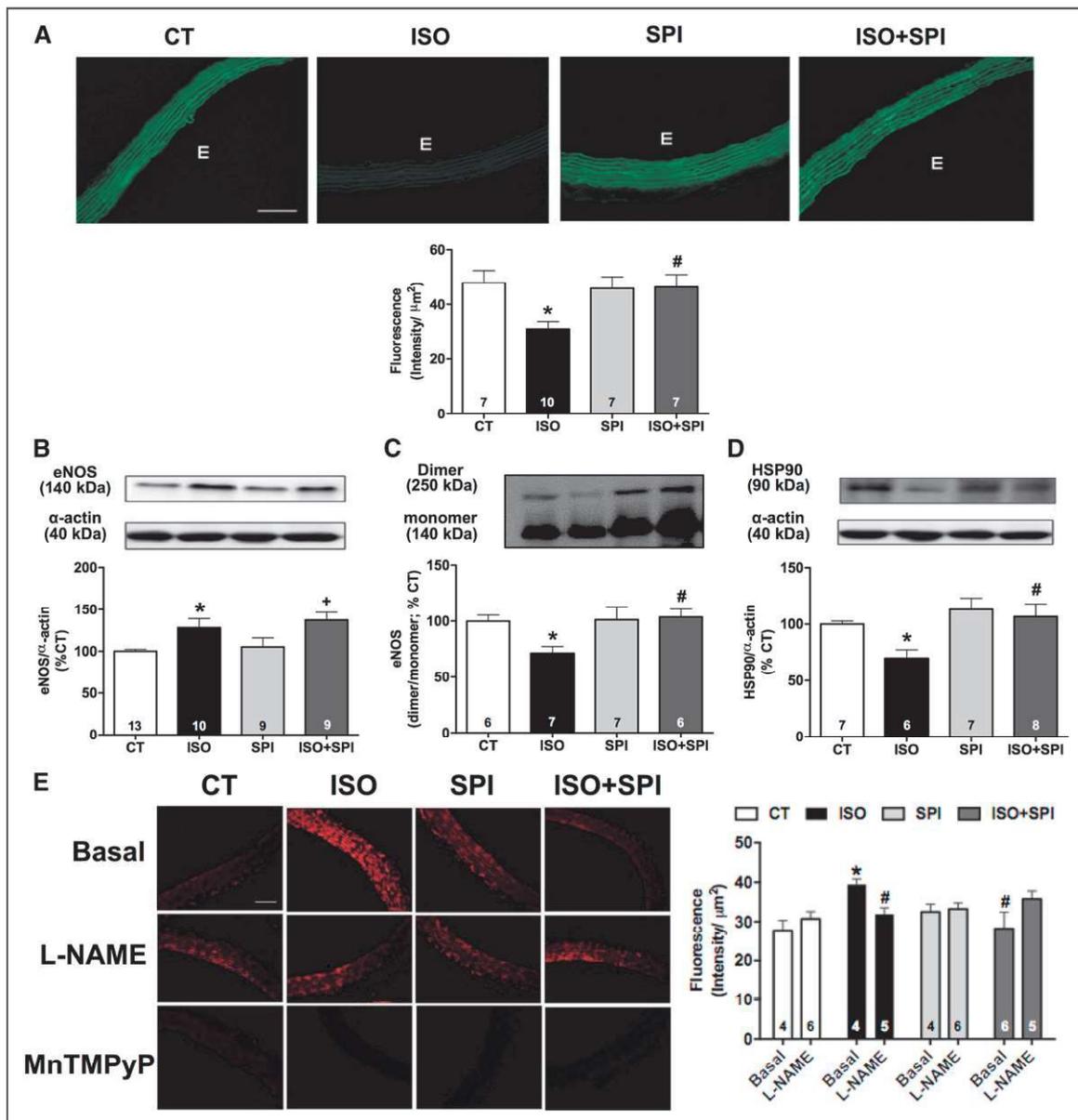
Incubation with a nonselective NOS inhibitor, *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester, enhanced the contractile response to phenylephrine in the aorta of all the groups (Figure 2A). The NOS-dependent anticontractile component of phenylephrine response (as measured by difference of the area under the curve before and after *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester) was impaired in the isoproterenol group, whereas spironolactone reversed this effect (Figure 2B). Pretreatment of aortas with superoxide dismutase (SOD, superoxide scavenger) or tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>, eNOS cofactor) reduced vascular contraction in the isoproterenol group but not in the control and spironolactone-treated groups (Figure 2C and 2E). There was an increased difference of the area under the curve to phenylephrine in the presence of SOD and BH<sub>4</sub> in isoproterenol-treated rats, which was normalized by spironolactone (Figure

2D and 2F). These data support a role for MR in increasing superoxide and reducing NO production and bioavailability after  $\beta$ -AR overstimulation. Indeed, aortic NO levels (evaluated by the fluorescence to diaminofluorescein) were decreased in rats exposed to long-term isoproterenol and spironolactone treatments enhanced NO to levels similar to the control group (Figure 3A). By contrast, losartan treatment did not prevent the impairment in NO bioavailability induced by isoproterenol (Figure S2).

Although aortic expression of total eNOS protein was increased in isoproterenol-treated rats (Figure 3B), the abundance of its dimeric form was reduced (Figure 3C), as well as its phosphorylation in Ser1177 (Figure S3). Spironolactone did not affect the isoproterenol-induced increase in total eNOS protein levels, but it normalized eNOS dimerization (Figure 3B and 3C). eNOS phosphorylation were not affected by spironolactone or losartan treatment (Figure S3). Because HSP90 is an eNOS chaperone that augments NO production and inhibits superoxide formation,<sup>16</sup> we investigated HSP90 expression. Isoproterenol treatment significantly reduced HSP90 protein expression, which was restored by spironolactone (Figure 3D).



**Figure 2.** Effect of *N* $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (A, square symbols), superoxide dismutase (superoxide dismutase (SOD, superoxide scavenger); C, triangle symbols), and tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>, eNOS cofactor) (E, diamond symbol) on the concentration–response curves to phenylephrine of aortic rings from control (CT) and isoproterenol (ISO) groups without or with spironolactone (SPI) treatment. B, D, and F, The difference of the area under the curve (dAUC) to phenylephrine in the presence and absence of L-NAME, SOD, or BH<sub>4</sub>, respectively. Data are expressed as mean $\pm$ SEM (n=4–15 in each group). Two-way ANOVA: *P*<0.05 +vs respective group without incubation; \*vs CT; #vs ISO.



**Figure 3.** Reduced HSP90 expression and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling after  $\beta$ -AR overstimulation: prevention by mineralocorticoid receptor blockade. Diaminofluorescein (DAF-2) fluorescence (A), protein expression of total eNOS (B), dimer:monomer eNOS ratio (C), HSP90 (D), and hydroethidine (DHE) fluorescence (E) obtained in aorta from control (CT) and isoproterenol (ISO) groups without or with spironolactone (SPI) treatment. Protein expression was calculated as percentage of CT group. Representative images (20 $\times$ , bar=100  $\mu$ m) of DAF-2 and DHE fluorescence are shown in left side of A and E, respectively. In A, E=endothelium. The DHE fluorescence signal was evaluated under basal condition or after incubation with  $N\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (1 mmol/L) or MnTMPyP (25  $\mu$ mol/L). Data represent mean $\pm$ SEM; number of animals used for each group is indicated in the bars. Two-way ANOVA:  $P < 0.05$  \*vs CT; +vs SPI; #vs ISO.

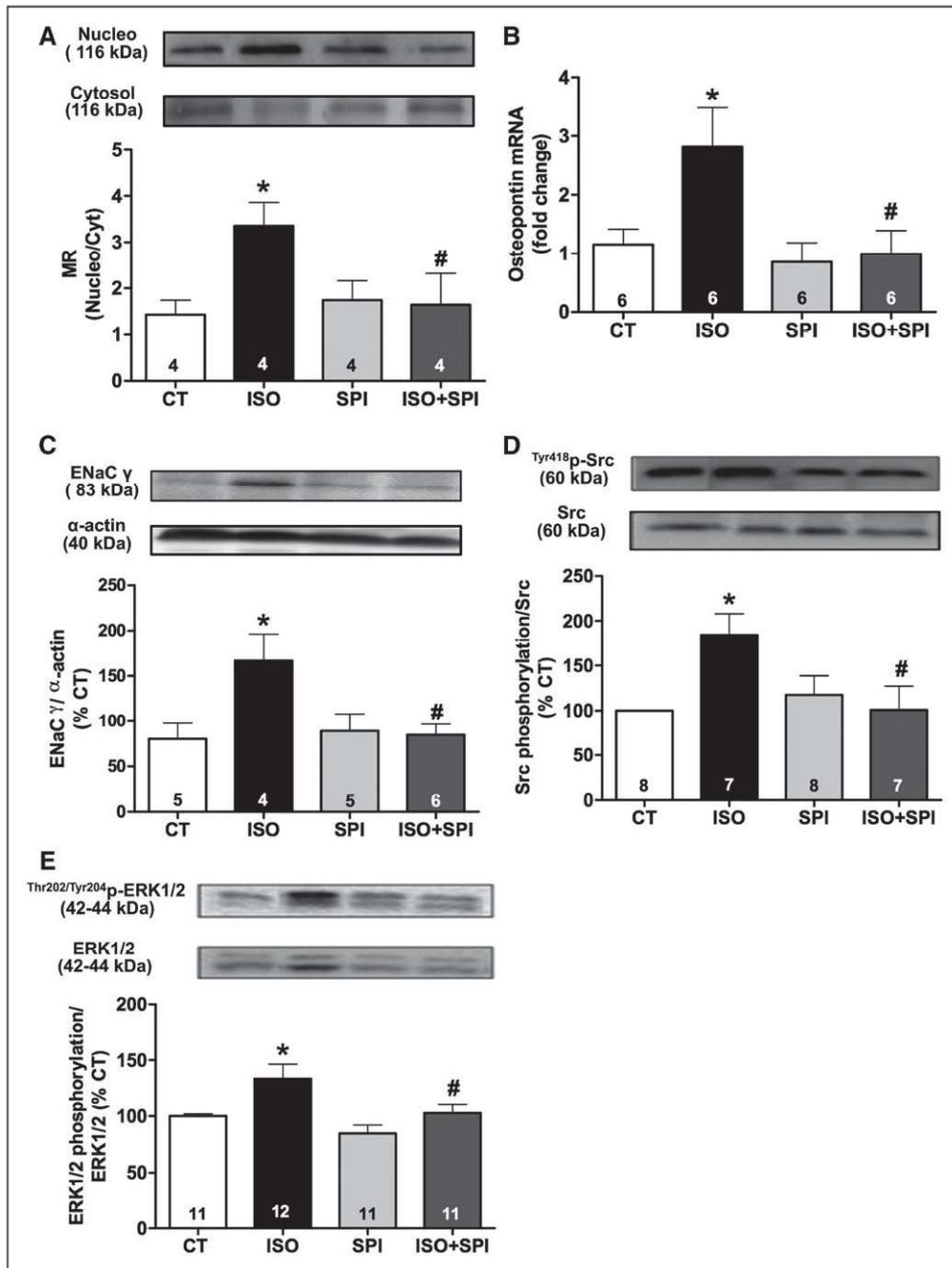
### eNOS-Derived Superoxide Anion Production After $\beta$ -AR Overstimulation Is Prevented by Spironolactone

We measured reactive oxygen species production by quantification of the fluorescence formed after exposing aortic slices to hydroethidine. The fluorescent signal was almost undetectable after incubation with the SOD mimetic MnTMPyP, indicating superoxide as the main reactive oxygen species detectable by hydroethidine in aortas (Figure 3E). Isoproterenol induced an increase in vascular superoxide production that was inhibited by  $N\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester incubation, indicating

enhanced eNOS-derived superoxide production (Figure 3E). Importantly, spironolactone, but not losartan, blocked this increase (Figure 3E; Figure S4). The data indicate that  $\beta$ -AR overstimulation induces vascular oxidative stress by eNOS, dependent on MR activation.

### $\beta$ -Adrenergic Overstimulation Activates Aortic MR Genomic and Nongenomic Activity

MR functions by translocating to the nucleus to regulate gene transcription (genomic mechanisms) and also by activating cytoplasmic signaling pathways (nongenomic mechanisms).



**Figure 4.** Genomic and nongenomic pathways of vascular mineralocorticoid receptor (MR) activity after isoproterenol treatment. Nuclear translocation of MR (A), mRNA expression of osteopontin (B), and protein expression of  $\gamma$ -epithelial sodium channel ( $\gamma$ ENaC; C), Src (D), and ERK1/2 (E) phosphorylation in thoracic aorta of control (CT) and isoproterenol (ISO) groups without or with spironolactone (SPI) treatment. Data represent mean $\pm$ SEM; number of animals used in each group is indicated into the bars. Two-way ANOVA:  $P < 0.05$  \*vs CT; #vs ISO.

Isoproterenol treatment increased the nuclear:cytoplasmic MR ratio in the aorta (Figure 4A) and increased gene expression of the smooth muscle cell MR target gene, osteopontin (Figure 4B) and the endothelial MR target protein, the  $\gamma$ -subunit of the epithelial sodium channel (ENaC; Figure 4C) when compared with the control group. Spironolactone prevented isoproterenol-induced MR nuclear translocation, osteopontin mRNA, and ENaC protein expression (Figure 4A through 4C) consistent with genomic MR activity. In addition, aorta from isoproterenol-treated rats demonstrated higher Src and ERK1/2 phosphorylation, which

was prevented by spironolactone (Figure 4D and 4E). Thus, chronic isoproterenol treatment seems to activate both MR genomic and nongenomic activities in the aorta.

#### Enhanced Corticosterone Levels and Increased Expression of 11 $\beta$ -HSD1 in PVAT After Isoproterenol Treatment

MR can be activated by the mineralocorticoid aldosterone and also by some corticosteroids. To investigate if isoproterenol activates the MR by modulating levels of endogenous ligands,

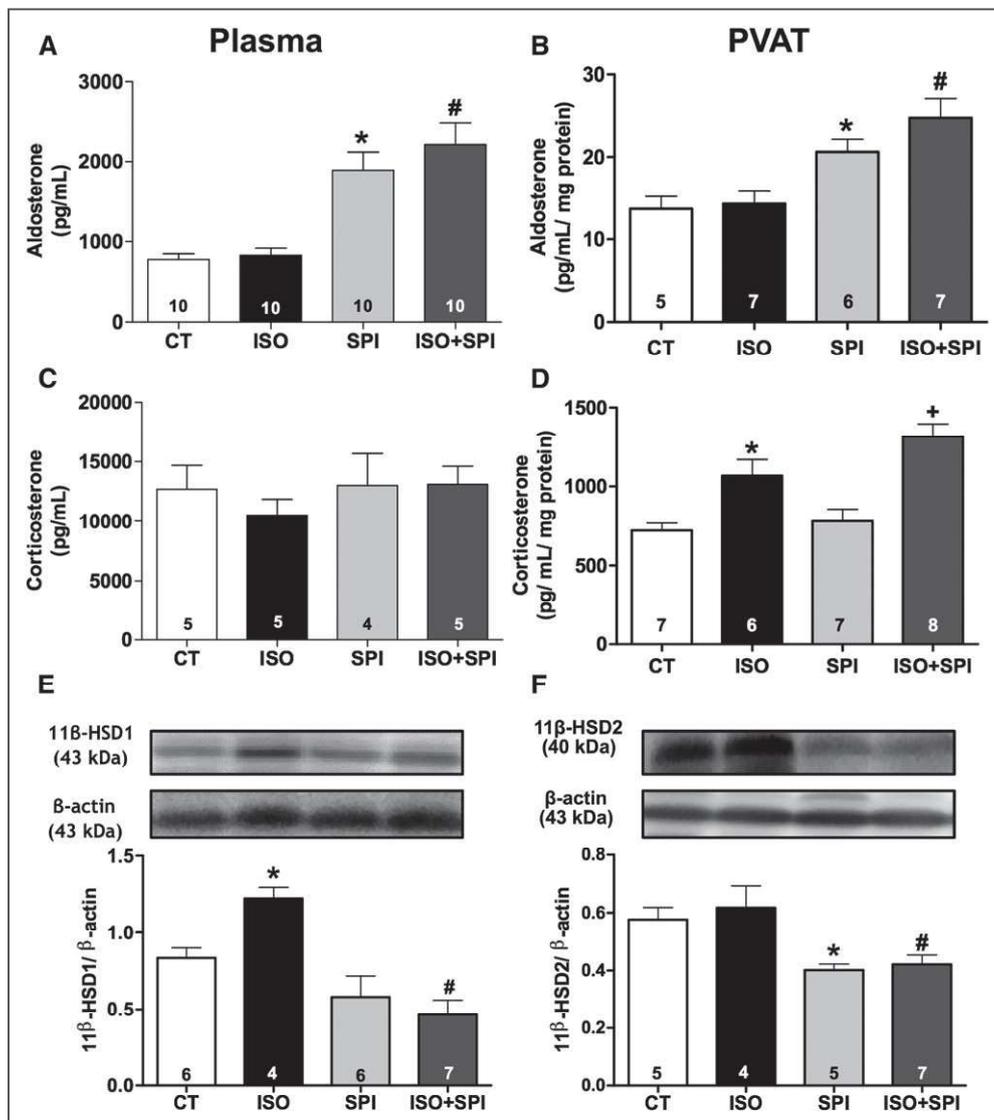
we measured plasma and PVAT levels of aldosterone and corticosterone (the main glucocorticoid in rodents). Plasma and PVAT levels of aldosterone were increased by spironolactone treatment, consistent with a feedback mechanism associated with effective MR blockade (Figure 5A and 5B). Neither isoproterenol nor spironolactone treatment affected plasma corticosterone levels (Figure 5C). However, corticosterone content was enhanced in PVAT after isoproterenol treatment, whereas spironolactone did not alter this effect (Figure 5D). Treatments did not affect aortic PVAT weight (data not shown). These data suggest that enhanced PVAT-derived corticosterone could be a mechanism leading to paracrine activation of vascular MR after  $\beta$ -adrenergic overstimulation.

PVAT protein expression of aldosterone synthase (CYP11B1), a final enzyme required for glucocorticoid synthesis, was not affected by isoproterenol treatment (Figure S5A); whereas, isoproterenol increased the PVAT expression

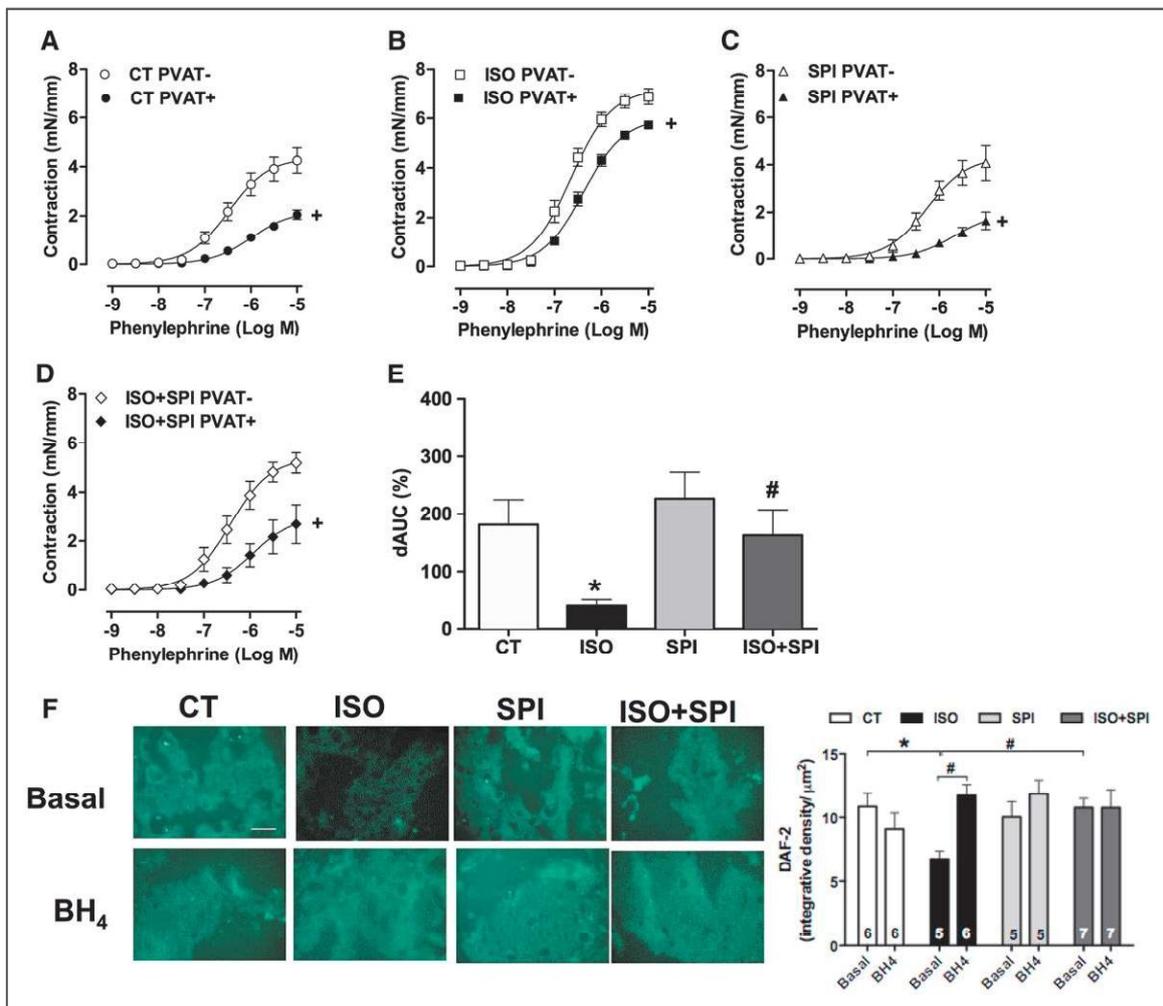
of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 (11 $\beta$ -HSD1), the enzyme that generates active glucocorticoids from their inactive 11-keto derivatives (Figure 5E), with no effect in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type-2 (11 $\beta$ -HSD2) expression (Figure 5F). Spironolactone decreased the expression of 11 $\beta$ -HSD1 and 11 $\beta$ -HSD2 (Figure 5E and 5F). Glucocorticoid synthase (CYP11B2) protein expression in PVAT did not differ from the control and isoproterenol groups (Figure S5B).

### Spironolactone Restores the Anticontractile Effect of Perivascular Tissue, Which Is Impaired by Isoproterenol

Next, we investigated the role of PVAT on vascular contraction to phenylephrine. As expected, the presence of PVAT reduced the contraction to phenylephrine in aortas from control rats (Figure 6A). However, this anticontractile effect of PVAT was impaired by isoproterenol treatment (Figure 6B and 6E).



**Figure 5.**  $\beta$ -AR overstimulation enhanced corticosterone content and protein expression of 11 $\beta$ -HSD1 in perivascular adipose tissue (PVAT) of aorta. Aldosterone (A and B) and corticosterone (C and D) content measured in plasma and aortic PVAT from control (CT) and isoproterenol (ISO) groups without or with spironolactone (SPI) treatment. Protein expression of 11 $\beta$ -HSD1 (E) and 11 $\beta$ -HSD2 (F) were evaluated in PVAT from CT, ISO, SPI, and ISO+SPI groups. Data represent mean $\pm$ SEM; number of animals is indicated in the bars. Two-way ANOVA:  $P < 0.05$  \*vs CT; +vs SPI; #vs ISO.



**Figure 6.** Impaired anticontractile function of perivascular adipose tissue (PVAT) after isoproterenol treatment is rescued by spironolactone. Concentration–response curves to phenylephrine were obtained in aortic rings without (–) or with (+) PVAT from control (CT, **A**) and isoproterenol (ISO, **B**) groups without or with spironolactone (SPI) treatment (**C** and **D**). **E**, The difference of the area under the curve (dAUC) to phenylephrine in the absence and presence of PVAT. Fluorescence to NO-sensitive dye diaminofluorescein (DAF-2) was evaluated in thoracic PVAT sections from CT, ISO, SPI, and ISO+SPI groups under basal conditions or after incubation with tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>, eNOS cofactor) (100  $\mu\text{mol/L}$ , **F**). Representative images (20 $\times$ , white bar=100  $\mu\text{m}$ ) of DAF-2 fluorescence are shown. Data are expressed as mean $\pm$ SEM ( $n=5$ –15 in each group). Two-way ANOVA:  $P<0.05$  +vs PVAT; \*vs CT; #vs ISO.

Spironolactone did not affect the basal role of PVAT on the contractile response to phenylephrine (Figure 6C and 6E) but rather, in the presence of MR antagonist, the anticontractile effect of PVAT was restored in rats cotreated with isoproterenol and spironolactone (Figure 6D and 6E).

Recently, it was demonstrated that PVAT from thoracic aorta expresses eNOS that produces NO as a PVAT-derived relaxing factor, whereas uncoupled eNOS in this tissue might be a mechanism involved in vascular dysfunction.<sup>17</sup> Therefore, we explored eNOS uncoupling in PVAT after  $\beta$ -adrenergic overstimulation. PVAT-derived NO production was impaired by isoproterenol treatment and restored by spironolactone treatment or BH<sub>4</sub> incubation (Figure 6F).

## Discussion

This study demonstrated that the MR antagonist spironolactone, but not the AT<sub>1</sub>R blocker losartan, prevented the increased vasoconstrictor response to phenylephrine induced by  $\beta$ -AR overstimulation. The protective vascular effect

of spironolactone was associated with (1) increased eNOS dimerization, HSP90 expression and NO production, (2) reduced eNOS-derived superoxide production, (3) inhibition of genomic and nongenomic vascular MR pathways, and (4) restoration of the anticontractile role of aortic PVAT. Furthermore, we found elevated corticosterone content in aortic PVAT after  $\beta$ -adrenergic stimulation. These findings support a model in which chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation promotes vascular MR activation, which results in eNOS uncoupling and oxidative stress. This model provides a novel mechanism by which MR antagonists can be protective in patients with cardiovascular disease by preventing vascular dysfunction associated with hyperadrenergic state, such as in heart failure, MI, and essential hypertension.

Renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors, including angiotensin-converting enzyme inhibitors and AT<sub>1</sub>R antagonists, and more recently MR antagonists improve survival in patients with left ventricular dysfunction.<sup>18,19</sup> The diuretic effect of the MR antagonist was not sufficient

to explain its cardioprotective effects in patients with heart failure.<sup>20</sup> Although both losartan and spironolactone reduced ventricular hypertrophy in a similar magnitude, we observed that only MR antagonism was effective in the prevention of increased vasoconstrictor response to phenylephrine, NO bioavailability, and eNOS-dependent oxidative stress. This result demonstrates for the first time a role of MR, but not AT1R, in mediating the major vascular effects of  $\beta$ -adrenergic overstimulation. In addition, losartan, but not spironolactone, reduced diastolic blood pressure measured invasively in anesthetized rats. However, we cannot exclude the possibility of group differences in blood pressure because we did not monitor this parameter 24 hours per day in awake, unrestrained animals.

Abnormal vasoconstrictor responses to agonists including phenylephrine have been demonstrated in several vascular beds<sup>2-5</sup> in the isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy model. These studies put forward a key role for  $\beta$ -AR overstimulation in inducing vascular dysfunction. We previously demonstrated a role for uncoupled eNOS in the altered vascular contractility induced by  $\beta$ -AR stimulation.<sup>5</sup> Because aldosterone-induced MR activation can impair eNOS-derived NO production associated with a reduction in eNOS dimerization in endothelial cells,<sup>21</sup> we hypothesized that MR blockade could improve this endothelial pathway. In accordance, improved NO bioavailability, enhanced eNOS dimer expression, and reduced eNOS-derived superoxide were observed in aortas from isoproterenol+spironolactone-treated rats. Although eNOS uncoupling was associated with exacerbated contractile response to phenylephrine, the endothelium-dependent relaxation to acetylcholine was not significantly changed by isoproterenol treatment. This apparently contradictory finding might be explained by the greater sensitivity of basal NO to destruction by superoxide when compared with agonist-stimulated NO production.<sup>22</sup>

Dimerization of eNOS regulates its catalytic activity and NO production. Association of eNOS with HSP90 has been demonstrated to be an important mechanism regulating eNOS dimerization, rather than eNOS phosphorylation.<sup>23</sup> Here, we show that  $\beta$ -AR overstimulation significantly reduced aortic expression of this chaperone, which was prevented by spironolactone. Interestingly, impaired interaction of HSP90 with eNOS results in decreased NO production and superoxide generation.<sup>16</sup> Therefore, reduced vascular expression of HSP90 is a potential link between  $\beta$ -AR overstimulation and eNOS dysfunction that can be prevented by MR blockade.

Increased nuclear:cytoplasmic MR ratio was found in aorta from isoproterenol-treated rats. Given that MR dissociation from HSP90 induces MR cytoplasmic-to-nucleus trafficking,<sup>24</sup> reduction in HSP90 expression induced by isoproterenol could also contribute to enhance MR transcriptional activity. Spironolactone treatment enhanced HSP90 expression and attenuated nuclear localization of MR, osteopontin mRNA, and ENaC protein levels in isoproterenol-treated rats. Osteopontin is a multifunctional glycoprophosphoprotein that can be secreted by endothelium and vascular smooth muscle cells; its gene expression is induced by MR and contributes to proinflammatory and profibrotic effects of aldosterone.<sup>25,26</sup> In addition, recent data suggest that MR activation induces binding to the ENaC promoter, increasing expression of ENaC mRNA

in endothelial cells with associated endothelial dysfunction.<sup>27</sup> We observed an increased aortic expression of the regulatory  $\gamma$ -subunit of ENaC in aorta of isoproterenol-treated rats that was prevented by cotreatment with spironolactone, suggesting that  $\beta$ -adrenergic stimulation might upregulate ENaC through MR activation. To our knowledge, this is the first demonstration that osteopontin and ENaC can be upregulated in vascular tissue in response to  $\beta$ -adrenergic stimulation and could be an additional mechanism involved in the vascular pathology associated with sympathetic hyperactivity.

In addition to genomic activity of MR, a nongenomic MR pathway in the vasculature has been demonstrated to contribute to oxidative stress, inflammation, and vascular dysfunction.<sup>11</sup> Aldosterone rapidly activates several kinases, including Src and mitogen-activated protein kinases in vascular smooth muscle cells.<sup>28</sup> Here, we reported that MR blockade attenuated phosphorylation of Src and ERK1/2 in aortas from isoproterenol-treated rats, which indicates convergence of the  $\beta$ -adrenergic and MR-signaling pathways. However, the observed association between the spironolactone-induced changes in the biochemical and molecular parameters evaluated and the vascular protection in the contractile function may not necessarily reflect cause and effect relationship, representing a limitation of this study.

Both aldosterone and glucocorticoids bind to the MR to activate its genomic and nongenomic functions.<sup>29</sup> In this study,  $\beta$ -AR overstimulation did not change either aldosterone or corticosterone plasma levels; however, corticosterone, but not aldosterone, was enhanced in aortic PVAT from isoproterenol-treated rats. Spironolactone did not attenuate the enhanced levels of corticosterone induced by isoproterenol in PVAT, suggesting that the beneficial vascular effects of spironolactone may be downstream and could be because of blockade of glucocorticoid-induced MR activation. Mature adipocytes express CYP11B2 and CYP11B1 and can produce aldosterone and corticosterone.<sup>12</sup> The expression of these enzymes was not modified by isoproterenol treatment. Glucocorticoid content is also regulated by 11 $\beta$ -HSD type 1 and 2. 11 $\beta$ -HSD2 converts glucocorticoids into inactive metabolites, which favors aldosterone-MR interaction. However, 11 $\beta$ -HSD1 in the presence of NADPH promotes glucocorticoids regeneration from inert 11-keto metabolites.<sup>30</sup> Therefore, an upregulation of 11 $\beta$ -HSD1 in PVAT after chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation might be a mechanism associated with high perivascular corticosterone content, thereby leading to paracrine activation of vascular MR. However, as  $\beta$ -AR signal through the small GTPase Rac1<sup>31</sup> which has been shown to activate MR without ligand,<sup>32</sup> we should also consider ligand-independent MR activation as a potential mechanism for isoproterenol-induced MR activation.

Spironolactone treatment prevented the isoproterenol-induced 11 $\beta$ -HSD1 expression in PVAT. Earlier studies demonstrated that suppression of 11 $\beta$ -HSD1 abolishes the inhibitory effect of glucocorticoids on eNOS expression<sup>33</sup> and prevents heart failure development after MI.<sup>34</sup> Therefore, reduction in 11 $\beta$ -HSD1 expression in PVAT is a potential cardiovascular protective mechanism of spironolactone. Despite this effect, corticosterone levels were still high in PVAT from rats cotreated with isoproterenol and spironolactone, which

could be related to the minor expression of 11 $\beta$ -HSD2 induced by spironolactone. However, the cellular origin of corticosterone secretion induced by isoproterenol in PVAT and the signaling pathway involved in this effect remains an open question. In addition, as endothelium, vascular smooth muscle cells, inflammatory cells and adipocytes express functional MR<sup>35–38</sup> further investigation using cell-type-specific knockout mice should address which cell-type-specific MR signaling is mediating the vascular effects induced by  $\beta$ -adrenergic stimulation.

In conclusion, our findings revealed a novel mechanism of regulation of vascular dysfunction mediated by  $\beta$ -AR overstimulation inducing PVAT-derived corticosterone production, associated with impaired PVAT anticontractile effect and vascular MR activation. MR blockade with spironolactone protected from increased vasoconstrictor response to phenylephrine, upregulation of ENaC, and downregulation of HSP90 and eNOS uncoupling. The present findings uncover a role for MR blockade in sympathoexcitatory cardiovascular diseases and provide an additional novel vascular mechanism for the protective effects of MR antagonism.

### Perspectives

We demonstrated that MR antagonist spironolactone prevents the vascular alterations induced by long-term  $\beta$ -AR stimulation, including enhanced vasoconstriction, uncoupling of eNOS, reduced NO bioavailability, and oxidative stress. The beneficial vascular effects of spironolactone were independent of changes in systemic levels of MR ligand. Instead, we observed increased levels of PVAT-derived corticosterone in response to  $\beta$ -adrenergic stimulation associated with enhanced protein levels of 11 $\beta$ -HSD1 that regenerates glucocorticoids. MR genomic and nongenomic signaling were observed in aortas of isoproterenol-treated rats. Therefore, this study suggests a novel link between  $\beta$ -AR signaling and vascular MR activation in causing vascular dysfunction. Moreover, the results indicate an additional mechanism for the protective vascular effects of MR antagonists in cardiovascular diseases associated with increased sympathetic activity, such as essential hypertension, MI, and heart failure.

### Acknowledgments

We thank Dr Gisele K. Couto for help in diaminofluorescein (DAF-2) and hydroethidine (DHE) analysis. We also thank Dr Maria O. de Souza for a generous gift of ENaC antibodies.

### Sources of Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Brazil grants 14/07947-6 and 11/15972-2) and Ministerio de Educación Cultura y Deporte (PHBP14/00001). A.P. Davel, D.V. Vassallo, and L.V. Rossoni are research fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

### Disclosures

None.

### References

- Grassi G. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. *Am J Hypertens*. 2010;23:1052–1060. doi: 10.1038/ajh.2010.154.

- Davel AP, Kawamoto EM, Scavone C, Vassallo DV, Rossoni LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *Br J Pharmacol*. 2006;148:629–639. doi: 10.1038/sj.bjp.0706749.
- Kim N, Chung J, Kim E, Han J. Changes in the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of the coronary artery during left ventricular hypertrophy. *Circ Res*. 2003;93:541–547. doi: 10.1161/01.RES.0000090087.66390.F2.
- Kim HK, Park WS, Warda M, Park SY, Ko EA, Kim MH, Jeong SH, Heo HJ, Choi TH, Hwang YW, Lee SI, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. Beta adrenergic overstimulation impaired vascular contractility via actin-cytoskeleton disorganization in rabbit cerebral artery. *PLoS One*. 2012;7:e43884. doi: 10.1371/journal.pone.0043884.
- Davel AP, Brum PC, Rossoni LV. Isoproterenol induces vascular oxidative stress and endothelial dysfunction via a G $\alpha$ -coupled  $\beta$ 2-adrenoceptor signaling pathway. *PLoS One*. 2014;9:e91877. doi: 10.1371/journal.pone.0091877.
- Oliveira EM, Krieger JE. Chronic beta-adrenoceptor stimulation and cardiac hypertrophy with no induction of circulating renin. *Eur J Pharmacol*. 2005;520:135–141. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.07.026.
- Zhang GX, Ohmori K, Nagai Y, Fujisawa Y, Nishiyama A, Abe Y, Kimura S. Role of AT1 receptor in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and oxidative stress in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42:804–811. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.01.012.
- Bos R, Mougnot N, Findji L, Médiani O, Vanhoutte PM, Lechat P. Inhibition of catecholamine-induced cardiac fibrosis by an aldosterone antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45:8–13.
- Martín-Fernández B, de las Heras N, Miana M, Ballesteros S, Valero-Muñoz M, Vassallo D, Davel AP, Rossoni LV, Cachofeiro V, Lahera V. Spironolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: involvement of serum- and glucocorticoid-regulated kinase type 1. *Exp Physiol*. 2012;97:710–718. doi: 10.1113/expphysiol.2011.063230.
- Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000;101:1653–1659.
- Moss ME, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in the pathophysiology of vascular inflammation and atherosclerosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:153. doi: 10.3389/fendo.2015.00153.
- Briones AM, Nguyen Dinh Cat A, Callera GE, Yogi A, Burger D, He Y, Corrêa JW, Gagnon AM, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP, Sorisky A, Ooi TC, Ruzicka M, Burns KD, Touyz RM. Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension*. 2012;59:1069–1078. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.190223.
- Löhn M, Dubrovská G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J*. 2002;16:1057–1063. doi: 10.1096/fj.02-0024com.
- Szaz T, Bomfim GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:105–116. doi: 10.2147/VHRM.S33760.
- Weston AH, Egner I, Dong Y, Porter EL, Heagerty AM, Edwards G. Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BKCa channels and adiponectin. *Br J Pharmacol*. 2013;169:1500–1509. doi: 10.1111/bph.12157.
- Pritchard KA Jr, Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2001;276:17621–17624. doi: 10.1074/jbc.C100084200.
- Xia N, Horke S, Habermeier A, Closs EI, Reifenberg G, Gericke A, Mikhed Y, Münzel T, Daiber A, Förstermann U, Li H. Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in perivascular adipose tissue of diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:78–85. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306263.
- Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, Konstam MA, Riegger G, Klinger GH, Neaton J, Sharma D, Thyagarajan B. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial—the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet*. 2000;355:1582–1587.
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurlley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular

- dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309–1321. doi: 10.1056/NEJMoa030207.
20. Rossignol P, Ménard J, Fay R, Gustafsson F, Pitt B, Zannad F. Eplerenone survival benefits in heart failure patients post-myocardial infarction are independent from its diuretic and potassium-sparing effects. Insights from an EPHESES (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study) substudy. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58:1958–1966. doi: 10.1016/j.jacc.2011.04.049.
  21. Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med*. 2007;13:189–197. doi: 10.1038/nm1545.
  22. Mian KB, Martin W. Differential sensitivity of basal and acetylcholine-stimulated activity of nitric oxide to destruction by superoxide anion in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 1995;115:993–1000.
  23. Chen W, Xiao H, Rizzo AN, Zhang W, Mai Y, Ye M. Endothelial nitric oxide synthase dimerization is regulated by heat shock protein 90 rather than by phosphorylation. *PLoS One*. 2014;9:e105479. doi: 10.1371/journal.pone.0105479.
  24. Galigniana MD, Echeverría PC, Erlejan AG, Piwien-Pilipuk G. Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus*. 2010;1:299–308. doi: 10.4161/nucl.1.4.11743.
  25. Sugiyama T, Yoshimoto T, Hirono Y, Suzuki N, Sakurada M, Tsuchiya K, Minami I, Iwashima F, Sakai H, Tateno T, Sato R, Hirata Y. Aldosterone increases osteopontin gene expression in rat endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336:163–167. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.056.
  26. Fu GX, Xu CC, Zhong Y, Zhu DL, Gao PJ. Aldosterone-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves MR, ERK, and p38 MAPK. *Endocrine*. 2012;42:676–683. doi: 10.1007/s12020-012-9675-2.
  27. Jia G, Habibi J, Aroor AR, Martinez-Lemus LA, DeMarco VG, Ramirez-Perez FI, Sun Z, Hayden MR, Meininger GA, Mueller KB, Jaffe IZ, Sowers JR. Endothelial mineralocorticoid receptor mediates diet-induced aortic stiffness in females. *Circ Res*. 2016;118:935–943. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.308269.
  28. Callera GE, Montezano AC, Yogi A, Tostes RC, He Y, Schiffrin EL, Touyz RM. c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2005;46:1032–1038. doi: 10.1161/01.HYP.0000176588.51027.35.
  29. Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280:F181–F192.
  30. Funder JW. Mineralocorticoid receptor activation and oxidative stress. *Hypertension*. 2007;50:840–841. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.098012.
  31. Moniri NH, Daaka Y. Agonist-stimulated reactive oxygen species formation regulates beta2-adrenergic receptor signal transduction. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:64–73. doi: 10.1016/j.bcp.2007.03.016.
  32. Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Marumo T, Aiba A, Sakurai T, Shindo T, Fujita T. Rac1-mediated activation of mineralocorticoid receptor in pressure overload-induced cardiac injury. *Hypertension*. 2016;67:99–106. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06054.
  33. Liu Y, Mladinov D, Pietrusz JL, Usa K, Liang M. Glucocorticoid response elements and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in the regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Cardiovasc Res*. 2009;81:140–147. doi: 10.1093/cvr/cvn231.
  34. White CI, Jansen MA, McGregor K, Mylonas KJ, Richardson RV, Thomson A, Moran CM, Seckl JR, Walker BR, Chapman KE, Gray GA. Cardiomyocyte and vascular smooth muscle-independent 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 amplifies infarct expansion, hypertrophy, and the development of heart failure after myocardial infarction in male mice. *Endocrinology*. 2016;157:346–357. doi: 10.1210/en.2015-1630.
  35. Jaffe IZ, Mendelsohn ME. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 2005;96:643–650. doi: 10.1161/01.RES.0000159937.05502.d1.
  36. Caprio M, Newell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ Res*. 2008;102:1359–1367. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.174235.
  37. Bene NC, Alcaide P, Wortis HH, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in immune cells: emerging role in cardiovascular disease. *Steroids*. 2014;91:38–45. doi: 10.1016/j.steroids.2014.04.005.
  38. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J*. 2007;21:2185–2194. doi: 10.1096/fj.06-7970com.

## Novelty and Significance

### What Is New?

- Spironolactone prevents the increased vasoconstrictor response to phenylephrine and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in aorta of a rat model of chronic  $\beta$ -adrenergic stimulation induced by isoproterenol.
- $\beta$ -AR overstimulation impairs the anticontractile function of perivascular adipose tissue and induces perivascular adipose tissue-derived glucocorticoid production.

### What Is Relevant?

- Mineralocorticoid receptor blockade with spironolactone prevented the vascular dysfunction induced by  $\beta$ -AR overstimulation, independent of changes in systemic levels of mineralocorticoid receptor ligands, sug-

gesting a novel mechanism for the protective vascular effects of mineralocorticoid receptor antagonists in cardiovascular diseases associated with increased sympathetic activity, such as essential hypertension and heart failure.

### Summary

Mineralocorticoid receptor activation is crucial for the vascular alterations induced by long-term  $\beta$ -AR stimulation, including increased vasoconstriction, uncoupling of endothelial nitric oxide synthase, and impaired anticontractile function of PVAT.

**Spirolactone Prevents Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Vascular Dysfunction Induced by  $\beta$ -Adrenergic Overstimulation: Role of Perivascular Adipose Tissue**

Jamaira A. Victorio, Stefano P. Clerici, Roberto Palacios, Maria J. Alonso, Dalton V. Vassallo, Iris Z. Jaffe, Luciana V. Rossoni and Ana P. Davel

*Hypertension*. 2016;68:726-735; originally published online July 18, 2016;

doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07911

*Hypertension* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.

Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/68/3/726>

Free via Open Access

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/content/suppl/2016/07/18/HYPERTENSIONAHA.116.07911.DC1>

**Permissions:** Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Hypertension* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

**Reprints:** Information about reprints can be found online at:

<http://www.lww.com/reprints>

**Subscriptions:** Information about subscribing to *Hypertension* is online at:

<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

**SUPPLEMENTAL MATERIAL****Spirolactone prevents eNOS uncoupling and vascular dysfunction induced by  $\beta$ -adrenergic overstimulation: role of perivascular adipose tissue**

Jamaira A. Victorio<sup>a</sup>, Stefano P. Clerici<sup>a</sup>, Roberto Palacios<sup>b</sup>, María J. Alonso<sup>b</sup>, Dalton V. Vassallo<sup>c</sup>, Iris Z. Jaffe<sup>d</sup>, Luciana V. Rossoni<sup>e</sup>, Ana P. Davel<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, Brazil;

<sup>b</sup>Department of Ciencias Básicas de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain;

<sup>c</sup>Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil;

<sup>d</sup>Molecular Cardiology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, MA, USA;

<sup>e</sup>Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brazil.

**Correspondence:**

Ana P. Davel, PhD

Department of Structural and Functional Biology

Institute of Biology

P.O. Box 6109, University of Campinas -UNICAMP

13083-865, Campinas, SP, Brazil

Telephone: +55 19 35216189

Fax: +55 19 35216185

E-mail: anadavel@unicamp.br

## **Supplemental methods**

### *Blood pressure, heart rate and myocardial hypertrophic index*

Under general anesthesia (urethane, 1.2 g.Kg<sup>-1</sup>, i.p.), a fluid-filled polyethylene catheter (PE-50) connected to a pressure transducer (MTL844 AdInstruments, Sydney-NSW, Australia) was placed on the right common carotid artery. Systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and heart rate were monitored during 30 min (LabChart 7, AdInstruments). Next, the rats were euthanized, the heart was removed, and the ratio of ventricle (right and left) weight to body weight was calculated.

### *Vascular reactivity*

The thoracic aorta was harvested and immediately placed in cold Krebs–Henseleit solution (in mM: 118 NaCl, 4.7 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11 glucose and 0.01 EDTA; pH=7.4). Transverse aortic segments (3 mm long) with or without PVAT were obtained and placed in an organ chamber bath (Panlab Harvard Apparatus, Cornellà-Barcelona, Spain) maintained at 37°C with a resting tension of 1 g, as previously described<sup>1</sup>. Isometric tension was recorded using a force transducer (MLT0420, AdInstruments) connected to an acquisition system (PowerLab 8/30 system, AdInstruments).

After 30 min of equilibration period, aortic rings were exposed to 75 mM KCl to assess the maximum tension. Following wash, rings were pre-contracted with a submaximal concentration of phenylephrine (1 µM) to obtain a relaxation response curve to acetylcholine (0.001-10 µM) and to sodium nitroprusside (0.001-1 µM). The constrictor response to phenylephrine (0.001-10 µM) was assessed in the absence or presence of the nonselective NOS inhibitor, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 µM), superoxide dismutase (SOD, 150 U/mL) or tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>, 100 µM) added 30 min before concentration-response curves to phenylephrine were performed.

### *Reactive oxygen species (ROS) and NO detection*

Frozen transverse sections (10  $\mu\text{m}$ ) from thoracic aorta and PVAT embedded in freezing medium were obtained. Slices were placed into a light-protected humidified chamber at 37°C and the following protocols were performed: 1) for NO measurement, slices from aorta and PVAT were incubated for 30 min with phosphate buffer (PB 0.1 mM, pH= 7.4) containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  and 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2, 8  $\mu\text{M}$ ).  $\text{BH}_4$  (100  $\mu\text{M}$ ) was applied in some PVAT slices in addition to DAF-2 in the latest 15 min; 2) for ROS analysis, slices were incubated with Krebs+HEPES buffer (in mM: 130 NaCl, 5.6 KCl, 2  $\text{CaCl}_2$ , 0.24  $\text{MgCl}_2$ , 8.3 HEPES and 11 glucose, pH= 7.4) plus dihydroethidium (DHE, 2  $\mu\text{M}$ ). The cell-permeable SOD mimetic MnTMPyP (25  $\mu\text{M}$ ) or L-NAME (1 mM) was topically applied in some aortic sections in addition to DHE.

Digital images were obtained with an epifluorescence microscope (Eclipse Ti-S, Nikon, Tokyo, Japan), using a fluorescein and a rhodamine filters, for DAF-2 and DHE analysis, respectively. The captured images under 20X objective were analyzed using Image J 1.46p software (National Institutes of Health, Bethesda- MD, USA) by measurement of the mean optical density of the fluorescence. Fluorescence was normalized by vessel or PVAT area ( $\mu\text{m}^2$ ).

### *Western blot analysis*

#### *Total and subcellular protein fraction*

Thoracic aorta and respective PVAT were homogenized in cold RIPA lysis buffer and added with 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  protease inhibitor cocktail (PIC) to obtain total protein extract.

For nuclear and cytosol fractions, pulverized aortas were homogenized in cold HEPES lysis buffer [10 mM HEPES (pH=7.9), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF and 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  PIC] and then centrifuged for 10 min at 850 g. The supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in lysis buffer containing 0.1% Triton-X. After 10 min, samples were centrifuged (10 min, 850 g) and the resulted supernatants were the cytosol protein fraction.

The resulted pellets were washed in ice-cold buffer [20 mM HEPES (pH= 7.9), 25% glycerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.0 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSF and 2 μL/mL PIC] and then centrifuged (15 min at 16,000 g, 4°C) to obtain the supernatants containing nuclear proteins.

Protein extracts (aorta: 50 μg for total, 15 μg for nuclear and cytosolic fractions; PVAT: 100 μg for total) were electrophoretically separated on 7.5 or 10% acrylamide SDS-PAGE at room temperature and then transferred to PVDF membranes using a Mini Trans-Blot Cell system (Bio-Rad, Hercules- CA, USA). After blocked with 5% non-fat milk in TBST for 2 h at room temperature, membranes containing total homogenates were incubated with primary antibodies against eNOS, Ser<sup>1177</sup> and Thr<sup>495</sup> phospho-eNOS, HSP90, ERK1/2, anti-Thr<sup>202/204</sup> phospho-ERK1/2, anti-Src and anti-Tyr<sup>418</sup> phospho-Src; anti-CYP11B1 (glucocorticoid synthase), anti-CYP11B2 (aldosterone synthase), 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11β-HSD) type 1 and type 2; anti-gamma-ENaC; membranes containing nuclear/cytosolic fractions were incubated with anti-MR antibody. After washing, membranes were incubated for 90 min with the horseradish peroxidase-conjugated IgG antibody according to each primary antibody used. Blots were detected with Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford-IL, USA) and visualized using ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Little Chalfont — Buckinghamshire, UK). The intensity was quantified by using the Image J 1.46p software (National Institutes of Health). Protein expression of α-actin (aorta), β-actin (PVAT), or Ponceau staining (nuclear/cytosolic fraction) were used to normalize expression of the evaluated proteins in each sample.

#### *eNOS dimerization*

eNOS dimerization was investigated as previously described<sup>2, 3</sup>. Briefly, thoracic aortas were longitudinally opened and incubated for 1 h at 4°C in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH= 8.0; 0.2% Nonidet P-40; 180 mM NaCl; 0.5 mM EDTA; 25 mM PMSF; 0.1 mM dithiothreitol; 2 μL/mL PIC). Non-boiled samples (75 μg) were separated by 6% SDS-PAGE at 4°C and transferred to PVDF membranes. After blockade (5% albumin in TBST), membranes were

incubated overnight at 4°C with primary antibody anti-eNOS (1:750), and then incubated for 90 min with the anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000). eNOS dimer (260 kDa) and monomer (130 kDa) blots were detected as described in western blot analysis section and then the dimer to monomer ratio was calculated.

#### *RT-PCR analysis*

Frozen thoracic aortas were homogenized in TRizol and RNA (1 µg) were used to obtain the cDNA (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Foster City- CA, USA). PCR reactions were made in duplicate in a thermocycler (ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems) using in the reaction for each sample 1 µL cDNA, 1 x *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), and 20 x *TaqMan Gene Expression Assay* (Osteopontin – *SPP1*: Rn00681031\_m1, Applied Biosystem) in a final volume of 20 µL. The amplification of GAPDH (Rn01775763\_g1, Applied Biosystem) was used as the intern normalization. Analysis of relative gene expression data was performed using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method<sup>4</sup>.

#### *Determination of plasma and perivascular aldosterone and corticosterone levels*

Blood samples were collected via abdominal aorta and then centrifuged to obtain plasma samples. PVAT surrounding thoracic aorta was weighted and 100 mg of the tissue was homogenized in cold PBS 0.1 M (pH= 7.4). Protein was quantified using Bradford reagent. The enzymatic immunoassay was performed for aldosterone (Aldosterone EIA kit – Monoclonal No 10004377, Cayman Chemical, Ann Arbor- MI, USA) and corticosterone (Corticosterone EIA kit No 500651, Cayman Chemical) following the manufacturer's instructions. Results were expressed as pg/mL for plasma samples and as pg/mL/mg protein for PVAT.

#### *Reagents*

Spirolactone and all reagents used for vascular reactivity, isoproterenol, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, HEPES, Tris, dithiothreitol, PIC, BH<sub>4</sub> and DAF-2 were purchased from Sigma-Aldrich CO (Saint Louis-MO, USA). Losartan was purchased from Medley (Campinas- São Paulo, BR). DHE was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY, USA), MnTMPyP from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and RIPA lysis buffer from Merck Millipore (Billerica- MA, USA).

Primary antibodies anti-phospho-eNOS<sup>Ser1177</sup>, anti-ERK1/2 and anti-phospho-ERK1/2 were purchased from Cell Signaling (Danvers- MA, USA); anti-eNOS from BD Transduction (Franklin Lakes- NJ, USA); anti-Src, anti-phospho-eNOS<sup>Thr495</sup>, anti-CYP11B1 and anti-CYP11B2 from Merck Millipore; anti-HSP90, anti-11β-HSD1, anti-11β-HSD2 and anti-β-actin from Santa Cruz (Dallas- TX, USA); anti-MR and anti-α-actin from Abcam (Cambridge, UK); anti-gamma-ENaC from StressMarq (Victoria-BC, Canada) and anti-phospho-Src from Invitrogen. Secondary antibodies were obtained from Abcam and Bio Rad.

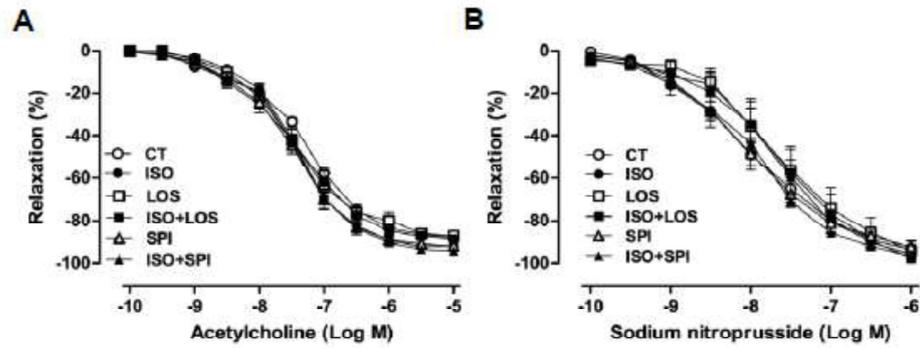
### Supplemental references

1. Davel AP, Kawamoto EM, Scavone C, Vassallo DV, Rossoni LV. Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *Br J Pharmacol*. 2006; 148:629-639.
2. Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, Cai S, Adlam D, Rockett K, Yokoyama M, Kawashima S & Channon KM. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ Res*. 2005; 97:864-871.
3. Davel AP, Brum PC, Rossoni LV. Isoproterenol induces vascular oxidative stress and endothelial dysfunction via a  $G_{i\alpha}$ -coupled  $\beta_2$ -adrenoceptor signaling pathway. *PLoS ONE*. 2014; 9: e91877.
4. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . *Methods*. 2001; 25:402-8.

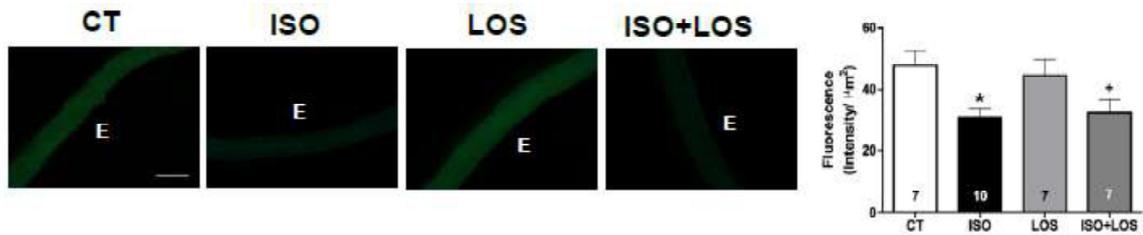
**Supplemental table****Table S1:** Morphometric parameters, blood pressure, and heart rate in experimental groups.

<b>Parameters</b>	<b>CT</b>	<b>LOS</b>	<b>SPI</b>	<b>ISO</b>	<b>ISO+ LOS</b>	<b>ISO+ SPI</b>
<b>BW (g)</b>	374 ± 14	397 ± 8	369 ± 8	365 ± 8	380 ± 7	364 ± 9
<b>VW/ BW (mg g<sup>-1</sup>)</b>	2.64 ± 0.06	2.52 ± 0.03	2.48 ± 0.03	3.45 ± 0.10*	3.14 ± 0.10 <sup>#</sup>	2.98 ± 0.03 <sup>#</sup>
<b>SBP (mmHg)</b>	113 ± 5.5	116 ± 3.6	126 ± 3.3	117 ± 2.4	104 ± 2.2	122 ± 2.5
<b>DBP (mmHg)</b>	74 ± 2.1	58 ± 3.9*	81 ± 4.0	81 ± 2.7	51 ± 3.1 <sup>#</sup>	83 ± 3.2
<b>HR (bpm)</b>	408 ± 8	412 ± 14	385 ± 11	386 ± 6	400 ± 14	382 ± 9

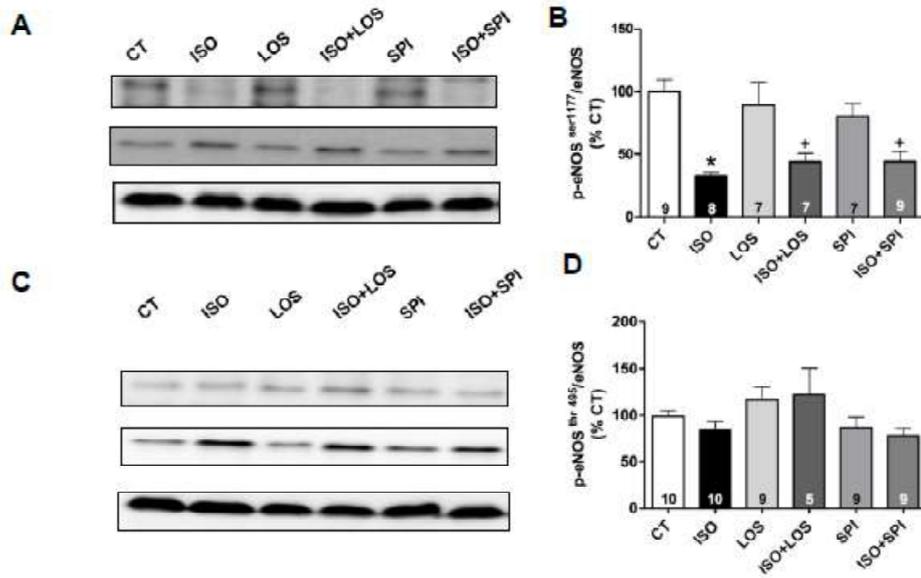
Values are expressed as mean ± SEM (N=8-12). CT: Control; ISO: isoproterenol; LOS: losartan; SPI: spironolactone; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; HR: heart rate; BW: body weight; VW: ventricle weight. Two-way ANOVA: \*p<0.05 vs. CT; <sup>#</sup>p<0.05 vs. ISO.

Supplemental figures

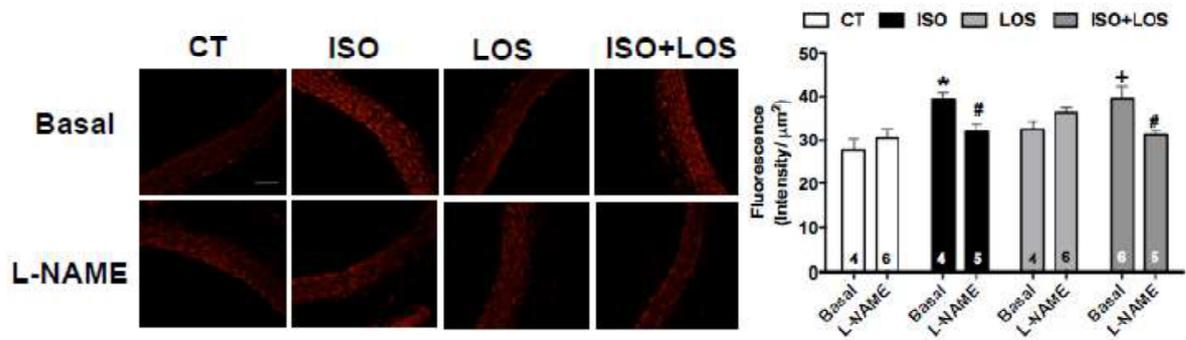
**Figure S1:** Isoproterenol (ISO) alone or combined with losartan (LOS) or with spironolactone (SPI) did not modify the vasorelaxation to acetylcholine (A) or to sodium nitroprusside (B) compared with control group (CT). Two-way ANOVA (n=4-12 in each experimental group).



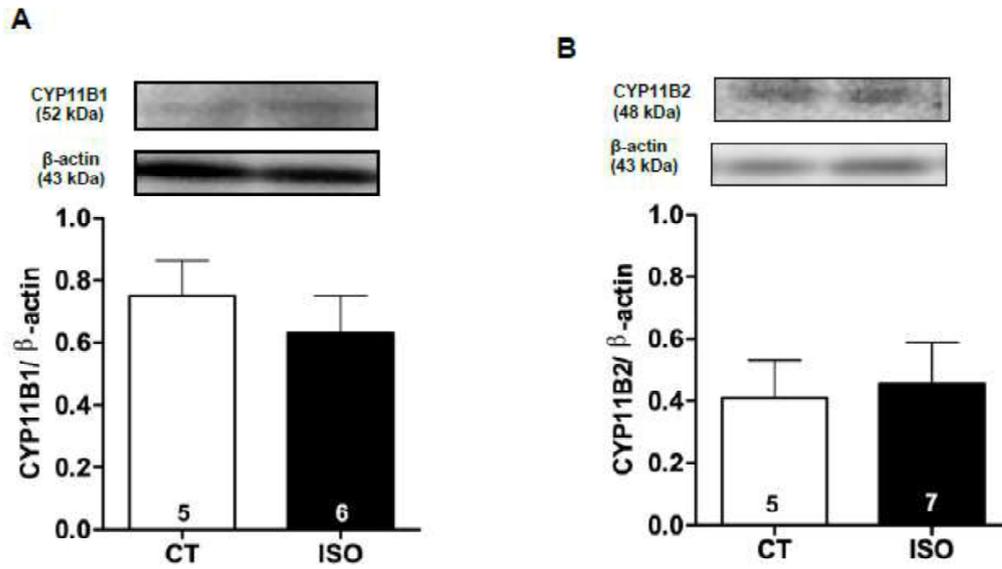
**Figure S2: Losartan (LOS) treatment did not ameliorate the impaired NO bioavailability induced by 7-day isoproterenol treatment (ISO).** Aorta from ISO-treated rats showed reduced diaminofluorescein (DAF-2) fluorescence indicating reduced NO levels that were not modified by co-treatment with LOS. Representative fluorescent images of DAF-2 are shown in left side of bar graph (20x, white bar=100  $\mu\text{m}$ ). Bar graphs represents mean  $\pm$  SEM; number of animals used in each group is indicated in the bars. Two-way ANOVA:  $p < 0.05$  \* vs. CT; + vs. LOS.



**Figure S3:** Ser1177 (A, B) and Thr495 (C, D) eNOS phosphorylation in thoracic aorta from control (CT) and isoproterenol (ISO) groups without or with treatment with spironolactone (SPI) or (LOS). Phospho-eNOS was quantified as ratio of total eNOS expression. \* $P < 0.05$  vs. CT; <sup>+</sup> $p < 0.05$  vs. SPI or LOS: Two-way ANOVA. Number of animals used in each group is showed into the bars.



**Figure S4: Losartan (LOS) treatment did not ameliorate vascular oxidative stress induced by 7-day isoproterenol treatment (ISO).** Oxidative fluorescent signal to hidroethidine (DHE) was obtained under basal condition or incubated with L-NAME (1 mM) in thoracic aortic sections from CT, ISO, LOS and ISO+LOS groups. Representative fluorescent images of DHE are shown in left side of bar graphs (20x, white bar=100 μm). Bar graphs represent mean ± SEM; number of animals used in each group is indicated in the bars. Two-way ANOVA:  $p < 0.05$  \* vs. CT; + vs. LOS; # vs. basal condition.



**Figure S5:** Protein expression of CYP11B1 (A) and CYP11B2 (B) in aortic PVAT from control (CT) and isoproterenol (ISO) groups. Upper panels show representative blots. Data represent mean  $\pm$  SEM; number of animals is indicated into the bars. Student's *t*-test:  $p > 0.05$ .



# Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues

Jamaira A. Victorio<sup>1†</sup>, Milene T. Fontes<sup>2†</sup>, Luciana V. Rossoni<sup>2\*</sup> and Ana P. Davel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil, <sup>2</sup> Vascular Physiology Lab, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Camille M. Balarini,  
Federal University of Paraíba, Brazil

### Reviewed by:

Zhihong Yang,  
University of Fribourg, Switzerland  
Agata Lages Gava,  
Universidade Federal do Espírito  
Santo, Brazil

### \*Correspondence:

Luciana V. Rossoni  
lrossoni@icb.usp.br  
Ana P. Davel  
anadavel@unicamp.br

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work.

### Specialty section:

This article was submitted to  
Integrative Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 11 May 2016

**Accepted:** 27 June 2016

**Published:** 12 July 2016

### Citation:

Victorio JA, Fontes MT, Rossoni LV  
and Davel AP (2016) Different  
Anti-Contractile Function and Nitric  
Oxide Production of Thoracic and  
Abdominal Perivascular Adipose  
Tissues. *Front. Physiol.* 7:295.  
doi: 10.3389/fphys.2016.00295

Divergent phenotypes between the perivascular adipose tissue (PVAT) surrounding the abdominal and the thoracic aorta might be implicated in regional aortic differences, such as susceptibility to atherosclerosis. Although PVAT of the thoracic aorta exhibits anti-contractile function, the role of PVAT in the regulation of the vascular tone of the abdominal aorta is not well defined. In the present study, we compared the anti-contractile function, nitric oxide (NO) availability, and reactive oxygen species (ROS) formation in PVAT and vessel walls of abdominal and thoracic aorta. Abdominal and thoracic aortic tissue from male Wistar rats were used to perform functional and molecular experiments. PVAT reduced the contraction evoked by phenylephrine in the absence and presence of endothelium in the thoracic aorta, whereas this anti-contractile effect was not observed in the abdominal aorta. Abdominal PVAT exhibited a reduction in endothelial NO synthase (eNOS) expression compared with thoracic PVAT, without differences in eNOS expression in the vessel walls. In agreement with this result, NO production evaluated *in situ* using 4,5-diaminofluorescein was less pronounced in abdominal compared with thoracic aortic PVAT, whereas no significant difference was observed for endothelial NO production. Moreover, NOS inhibition with L-NAME enhanced the phenylephrine-induced contraction in endothelial-denuded rings with PVAT from thoracic but not abdominal aorta. ROS formation and lipid peroxidation products evaluated through the quantification of hydroethidine fluorescence and 4-hydroxynonenal adducts, respectively, were similar between PVAT and vessel walls from the abdominal and thoracic aorta. Extracellular superoxide dismutase (SOD) expression was similar between the vessel walls and PVAT of the abdominal and thoracic aorta. However, Mn-SOD levels were reduced, while CuZn-SOD levels were increased in abdominal PVAT compared with thoracic aortic PVAT. In conclusion, our results demonstrate that the anti-contractile function of PVAT is lost in the abdominal portion of the aorta through a reduction in eNOS-derived NO production compared with the thoracic aorta. Although relative SOD isoforms are different along the aorta, ROS formation, and lipid peroxidation seem to be similar. These findings highlight the specific regional roles of PVAT depots in the control of vascular function that can drive differences in susceptibility to vascular injury.

**Keywords:** thoracic aorta, abdominal aorta, nitric oxide, oxidative stress, perivascular adipose tissue, endothelium

## INTRODUCTION

Aortic atherosclerotic lesion and aneurysm are predominant in the abdominal rather than the thoracic portion of the aorta, suggesting inherent properties influencing regional aortic susceptibility to injury; however, the mechanisms involved in this susceptibility are not well understood. Despite being segments of the same artery, elastic features, and collagen contents vary along the aorta, which contribute to the physiological characteristics of pulse wave and blood distribution (Sokolis et al., 2008; Tsamis et al., 2013). Moreover, although the levels of endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine appear to be similar (Oloyo et al., 2012), the mechanisms involved in the alpha-adrenergic-mediated contraction might differ in the thoracic vs. the abdominal aorta (Lamb et al., 1994; Asbún-Bojalil et al., 2002).

It has been demonstrated that perivascular adipose tissue (PVAT), an adipose depot surrounding most arteries, plays an important role in vascular homeostasis (Szasz and Webb, 2012). PVAT of murine thoracic aorta secretes vasoactive substances, including adiponectin (Fésus et al., 2007), angiotensin 1–7 (Lee et al., 2009), leptin (Gálvez-Prieto et al., 2012), H<sub>2</sub>S (Fang et al., 2009), and a still unidentified adipocyte-derived relaxing factor(s) (ADRFs; Fésus et al., 2007; Schleifenbaum et al., 2010; Oriowo, 2015). These vasoactive factors can induce an anti-contractile effect through endothelial nitric oxide (NO) synthesis and release (Gálvez-Prieto et al., 2012) and/or through activation of vascular smooth muscle K<sup>+</sup> channels (Gao et al., 2007). More recently, it was also demonstrated that PVAT from the thoracic aorta expresses the endothelial isoform of NO synthase (eNOS; Araujo et al., 2015; Xia et al., 2016) and produces NO. PVAT-derived NO mediates relaxation of the adjacent thoracic aortic wall, indicating NO as a potential ADRF in this vessel (Xia et al., 2016).

Along the aorta, the phenotype of the PVAT is distinguished. Abdominal aorta PVAT resembles the phenotype of white adipose tissue (WAT), while fat surrounding the thoracic aorta shares the characteristics of brown adipose tissue (BAT; Police et al., 2009; Fitzgibbons et al., 2011). In addition, the expression levels of inflammatory genes and markers of immune cell infiltration are greater in abdominal PVAT than in thoracic PVAT, suggesting that the WAT phenotype is more pro-inflammatory and atherogenic than the BAT phenotype in PVAT (Padilla et al., 2013). Accordingly, PVAT from human coronary arteries with the WAT phenotype exhibits a pro-inflammatory profile with reduced adiponectin levels compared to BAT subcutaneous and peri-renal adipocyte depots (Chatterjee et al., 2009).

Although the anti-contractile and anti-inflammatory effects of thoracic aortic PVAT are well-known, the possible role of PVAT regulating the vascular reactivity and redox status of the abdominal aorta is still poorly understood. A previous study demonstrated that the anti-contractile effect of abdominal aortic PVAT is less pronounced when compared to the thoracic portion of the aorta (Watts et al., 2011). However, the mechanism involved in this regional difference remains unclear. This study aimed at investigating the comparative effects of thoracic vs. abdominal aortic PVAT on anti-contractile function, the oxidative profile, and NO synthesis and availability.

## METHODS

### Animals

All animal procedures were in accordance with the ethical principles for animal experimentation adopted by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL/COBEA) and were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Campinas—UNICAMP (protocol number: 3523-1) and of the Institute of Biomedical Science at the University of Sao Paulo (protocol number 53, sheet 19, book 03).

Experiments were conducted in 3- to 4-month-old male Wistar rats (Multidisciplinary Center for Biological Research, UNICAMP) maintained at a constant room temperature (22–24°C) and light cycle (12:12 h light:dark) with food and water allowed *ad libitum* to all animals. At the time of the experiments, animals were euthanized under anesthesia (ketamine 80 mg/kg and xylazine 5 mg/kg; *i.p.*).

### Vascular Reactivity Study

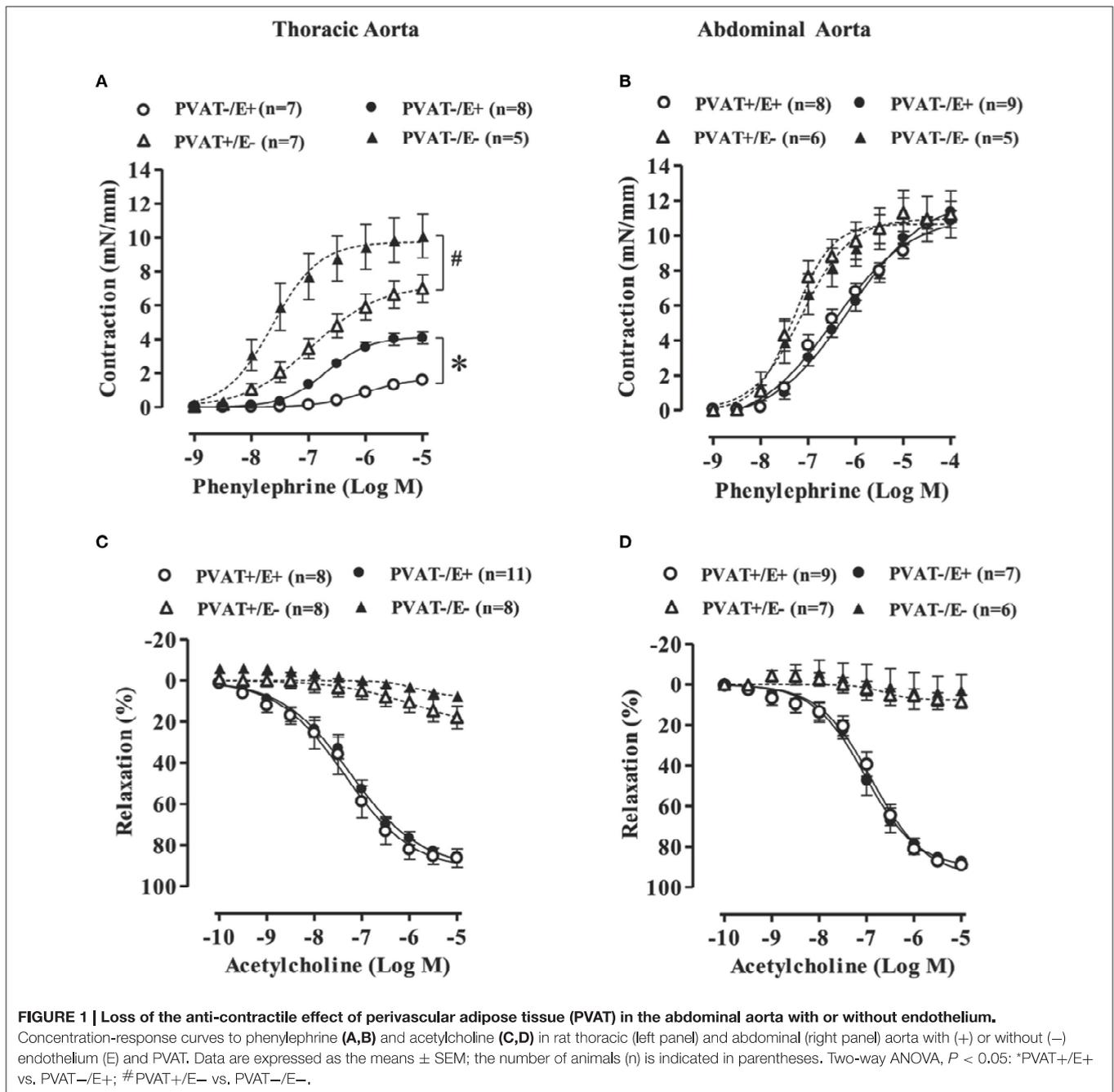
Thoracic and abdominal aorta were isolated, placed in Petri dishes with cold Krebs-Henseleit solution (in mM: 118 NaCl, 4.7 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11 glucose and 0.01 EDTA) and sectioned into 3-mm rings with or without PVAT. In some experiments, endothelial cells were removed by gently rolling the preparation back and forth with a needle. Rings were mounted at a resting tension of 1 g in an organ chamber bath (Panlab Harvard Apparatus, Cornellà - Barcelona, Spain) containing Krebs-Henseleit solution continuously aerated with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> (pH = 7.4; 37°C) as previously described (Davel et al., 2006, 2008). Isometric tension was recorded using an isometric force transducer (MLT0420, AdInstruments) connected to an acquisition PowerLab 8/30 system for tension recording (LabChart 7, AdInstruments).

After a 30-min equilibration period, all aortic rings were initially exposed twice to 75 mM KCl, the first to check their functional integrity and the second to assess the maximum contractility. Following the wash, vascular reactivity was investigated with cumulative concentration-response curves to acetylcholine (0.1 nM – 10 μM) in vessels contracted with phenylephrine (1 μM). Endothelial denudation was confirmed by acetylcholine-induced relaxation <10%. After the samples

**TABLE 1 | Potency (–LogEC50) and maximal response (Rmax) values to phenylephrine-induced contraction in thoracic and abdominal aortas with (+) or without (–) endothelium (E) and perivascular adipose tissue (PVAT).**

	Thoracic aorta		Abdominal aorta	
	Rmax (mN/mm)	–LogEC50	Rmax (mN/mm)	–LogEC50
PVAT–E+	4.1 ± 0.3(8)	6.6 ± 0.04(8)	10.5 ± 1.2(9)	6.3 ± 0.50(9)
PVAT+E+	1.5 ± 0.1*(7)	5.9 ± 0.09*(7)	9.4 ± 1.5(8)	6.6 ± 0.37(8)
PVAT–E–	10.1 ± 1.2(5)	7.5 ± 0.15(5)	11.8 ± 0.9(5)	7.0 ± 0.63(5)
PVAT+E–	7.0 ± 0.8 <sup>#</sup> (7)	6.9 ± 0.12 <sup>#</sup> (7)	11.6 ± 3.0(6)	7.2 ± 0.22(6)

Data are expressed as the means ± SEM; the number of animals is indicated in the parenthesis. Student's *t*-test, *P* < 0.05: \*PVAT+/E+ vs. PVAT–/E+; <sup>#</sup>PVAT+/E– vs. PVAT–/E–.

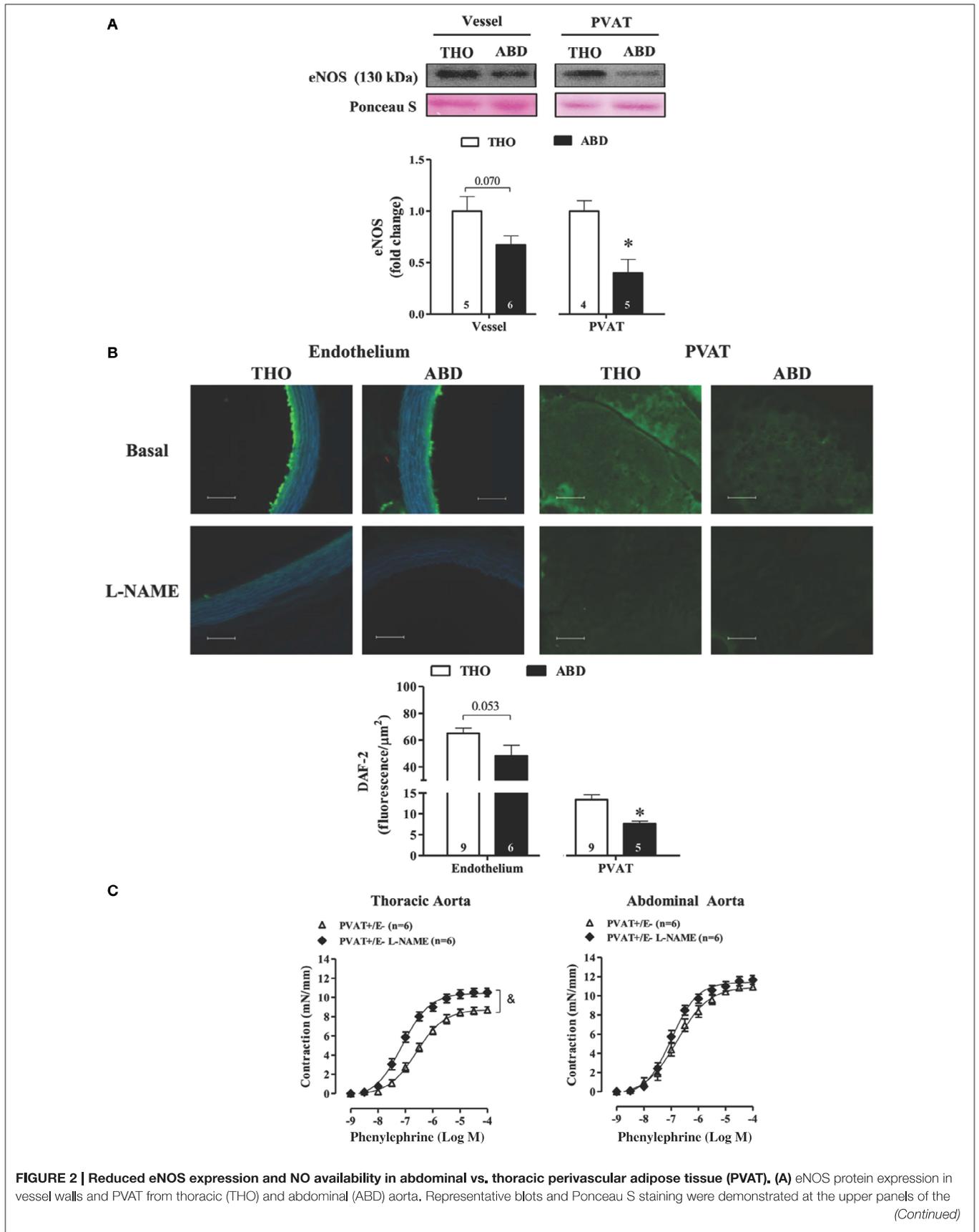


were washed, the contractile response to phenylephrine (1 nM – 10  $\mu$ M for thoracic aorta and 1 nM – 100  $\mu$ M for abdominal aorta) was evaluated. Some aortic rings with PVAT and without endothelium were incubated with NO synthase inhibitor L-NAME (100  $\mu$ M) for 30 min prior to phenylephrine concentration-response curves.

At the end of the experiments, the length of each ring was measured. Vasoconstrictor responses to phenylephrine are expressed as mN/mm. Relaxation responses to acetylcholine are expressed as the percentage of relaxation of the contractile response induced by phenylephrine (1  $\mu$ M).

## Nitric Oxide (NO) and Reactive Oxygen Species (ROS) Evaluation *In situ*

Thoracic and abdominal aortic tissues with their respective coated PVAT were isolated, placed in Petri dishes with cold Krebs-Henseleit solution, cleaned and sectioned into 3-mm rings. Next, in a dark chamber, aortic segments were incubated for 30 min with Krebs-Henseleit solution (pH = 7.4, 37°C) plus 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2, 10  $\mu$ M) or with dihydroethidium (DHE, 2  $\mu$ M) for NO and ROS measurement, respectively, as previously described (Gil-Ortega et al., 2014). Some aortic segments were co-incubated with DAF-2 plus



**FIGURE 2 | Continued**

figure and densitometric analysis is expressed as a fold change of THO expression at the bottom panel. **(B)** Top panels—Representative fluorographs of 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2) signal obtained in transverse sections of vessel walls and PVAT from THO and ABD aortic tissues in the absence (upper panel) and presence (lower panel) of L-NAME. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (20X objective). Bottom panel—Quantified NO availability, measured as DAF-2 fluorescence intensity in the endothelial layer and PVAT of THO and ABD aorta. **(C)** Concentration-response curves to phenylephrine in rat thoracic (left panel) and abdominal (right panel) aorta without (–) endothelium (E) and with (+) PVAT in the absence or presence of L-NAME. Data are expressed as the means  $\pm$  SEM; the number of animals is indicated in the bars or in parenthesis. Student's *t*-test,  $P < 0.05$ : \*ABD vs. THO PVAT; Two-way ANOVA,  $P < 0.05$ : & PVAT+E– vs. PVAT+E– L-NAME.

L-NAME (1 mM) to evaluate the specific generation of NO from NO synthase or with DHE plus MnTMPyP (25  $\mu\text{M}$ ), a cell-permeant superoxide dismutase (SOD) mimetic, to evaluate superoxide anion formation. Subsequently, the aortic segments with PVAT were fixed in 4% paraformaldehyde for 4 h and then embedded in freezing medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA). Transverse sections (20  $\mu\text{m}$  thick) of frozen arteries were obtained on a cryostat. Digital images were collected on a microscope (Nikon, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan) equipped with epifluorescence and fluorescein/rhodamine filters using a 20X objective. The images were analyzed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). NO availability was evaluated by DAF-2 mean optical density of the fluorescence in the endothelium and PVAT, and ROS production were analyzed based on the integrated density of the DHE fluorescence normalized by the number of nuclei labeled with ethidium bromide (EB-positive nuclei) in the vascular wall segment of the aorta and its respective PVAT.

### Western Blotting

Total protein extracts were obtained from abdominal and thoracic aortic samples and their respective PVAT depots. Tissues were homogenized in cold RIPA lysis buffer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) containing phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM PMSF),  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (1 mM) and protease inhibitor cocktail (2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  PIC, Sigma-Aldrich).

Protein extracts (75  $\mu\text{g}$ ) were separated by SDS–PAGE, and proteins were transferred to PVDF membranes (GE HealthCare, Little Chalfont-Buckinghamshire, UK) using a Mini Trans-Blot Cell system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) containing 25 mM Tris, 190 mM glycine, 20% methanol and 0.05% SDS. Membranes were blocked for 90 min at room temperature with 5% albumin in Tris buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl and 0.1% Tween 20). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies anti-eNOS (1:750; BD Transduction, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-EC-SOD (1:1,000; Enzo Life Science, Farmingdale, New York, USA), anti-Mn-SOD (1:1,000; Enzo Life Science), anti-CuZn-SOD (1:5,000; Sigma Aldrich), and anti-4-hydroxynonenal (4-HNE; 1:2,000; Abcam, Cambridge, UK).

After washing, membranes were incubated for 90 min with a peroxidase-conjugated IgG antibody specific for the primary antibody used. Protein expression was detected with Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), and the membranes were subjected to autoradiography (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare). The blots were digitized, and intensity was quantified using ImageJ 1.46p software (National Institutes of Health). Ponceau staining was

used to normalize expression of the evaluated proteins in each sample.

### Drugs

Acetylcholine chloride, phenylephrine hydrochloride, L-NAME, and DAF-2 were purchased from Sigma-Aldrich CO (Saint Louis, MO, USA). MnTMPyP was purchased from Calbiochem (Merck Millipore). DHE was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY, USA).

### Statistical Analysis

Results are expressed as the means  $\pm$  SEM. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Corp., USA). Concentration–response curves were analyzed using two-way ANOVA followed by the Bonferroni's post-test. For comparisons between abdominal and thoracic aortic samples in the same condition, the Student *t*-test was used. Values of  $P < 0.05$  were considered significantly different.

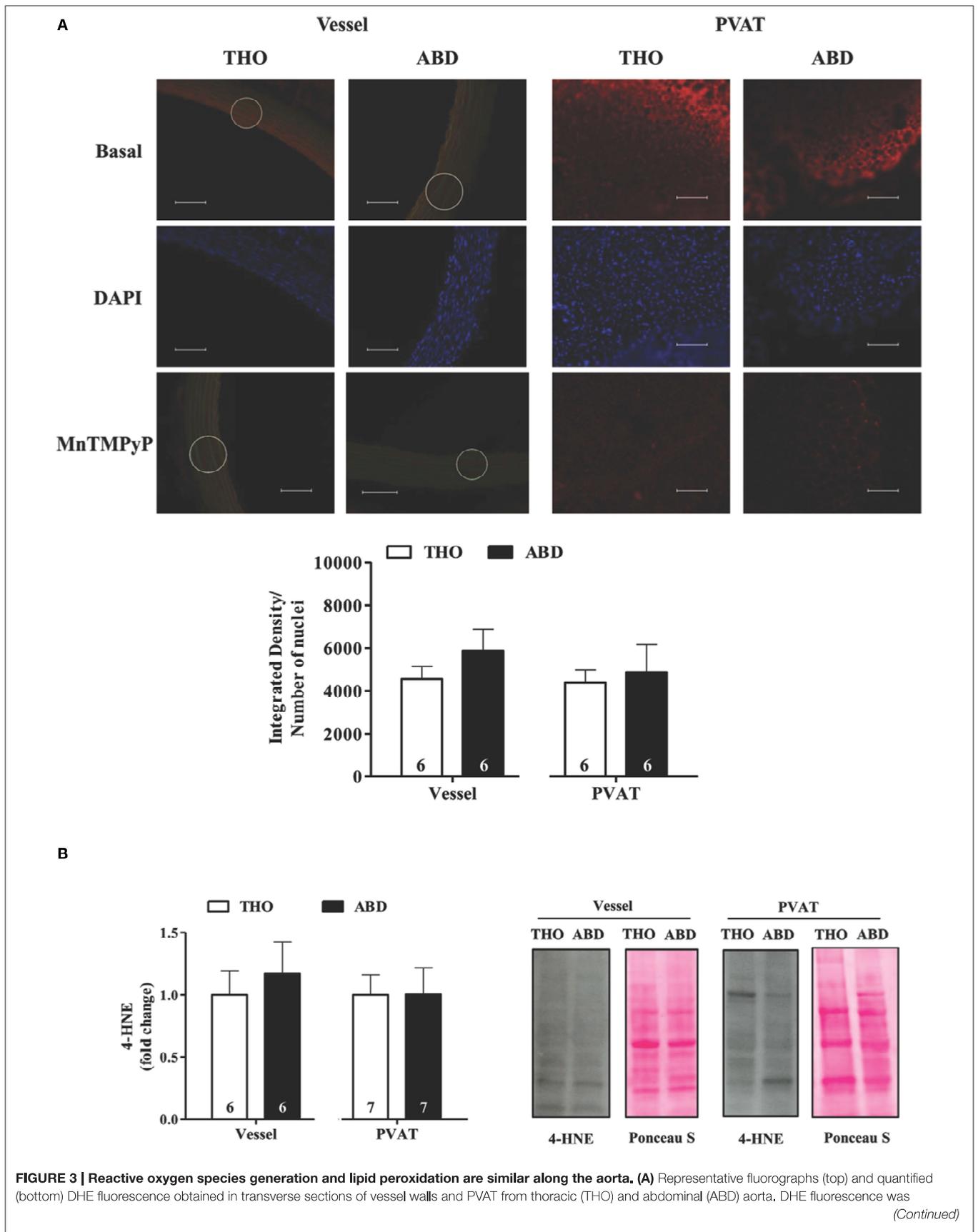
## RESULTS

### PVAT Exerts an Anti-Contractile Effect in the Thoracic but Not the Abdominal Aorta

To determine the anti-contractile effects of PVAT in thoracic and abdominal aortic tissues, we performed concentration-response curves to phenylephrine in rings with (open symbols) or without (filled symbols) PVAT in intact (circle) or denuded (triangle) endothelium. Thoracic aortic rings with PVAT and intact endothelium (PVAT+E+) presented a significant reduction in potency and maximal response to phenylephrine when compared to rings without PVAT (PVAT–E+; **Figure 1A** and **Table 1**). Although the endothelium damage increased the phenylephrine-induced contraction (compare PVAT–/E+ vs. PVAT–/E–, **Figure 1A**), the anti-contractile effect of PVAT was still observed in endothelium-denuded rings. Thus, the presence of PVAT (PVAT+E–) in endothelium-denuded rings also reduced both the potency and maximal response to phenylephrine when compared to rings without PVAT and endothelium (PVAT–E–; **Figure 1A** and **Table 1**). In contrast, the presence of PVAT did not alter the phenylephrine-induced contraction in either intact or denuded endothelium abdominal aortic rings (**Figure 1B** and **Table 1**).

KCl-induced contractions were similar in both thoracic and abdominal aortic segments without (PVAT–E+; THO:  $8.0 \pm 0.5$  vs. ABD:  $8.7 \pm 0.4$  mN/mm) or with PVAT (PVAT+E+; THO:  $9.4 \pm 0.5$  vs. ABD:  $7.7 \pm 0.5$  mN/mm).

We also assessed the endothelium-dependent relaxation response to acetylcholine in thoracic and abdominal aorta.



**FIGURE 3 | Continued**

evaluated at the basal level and in the presence of the SOD mimetic MnTMPyP. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (20X objective). Values of the integrated density of hydroethidine-positive (EB-positive) nuclei fluorescence were normalized to nuclei number, which was analyzed by DAPI staining in each sample. **(B)** Expression of 4-hydroxynonenal (4-HNE) adducts in vessel walls and PVAT from ABD and THO aorta. Representative blots and Ponceau S staining were demonstrated at the right panel and densitometric analysis is expressed as the fold change of THO expression (left panel). Data are expressed as the means  $\pm$  SEM; the number of animals is indicated in the bars of the graph. Student's *t*-test.

As expected, endothelium damage blocked the vasodilatation induced by acetylcholine in both thoracic and abdominal aorta (**Figures 1C,D**). However, no effects of PVAT on the acetylcholine-induced relaxation were observed in either thoracic or abdominal aorta (**Figures 1C,D**).

### eNOS Expression and NO Availability Is Impaired in PVAT of the Abdominal Aorta

There was a non-significant trend ( $p < 0.07$ ) toward reduced eNOS protein expression in the abdominal when compared to the thoracic aorta (**Figure 2A**), whereas abdominal PVAT showed a 60% reduction in eNOS expression compared with thoracic PVAT (**Figure 2A**). In accordance with these data, NO availability evaluated based on DAF-2 fluorescence was not significantly altered in the endothelium of abdominal vs. thoracic aorta ( $p < 0.053$ ), but abdominal PVAT showed a decrease in NO availability of 34% compared with thoracic PVAT (**Figure 2B**). L-NAME incubation significantly reduced NO bioavailability in both the endothelium and PVAT of abdominal and thoracic portions of aorta (**Figure 2B**).

The role of NO-derived from PVAT on phenylephrine-induced contraction was evaluated by the L-NAME incubation in thoracic and abdominal PVAT+E- rings. L-NAME increased the potency and maximal response to phenylephrine in thoracic (Rmax: PVAT+/E- =  $8.7 \pm 0.3$  vs. PVAT+/E- L-NAME =  $10.5 \pm 0.4$  mN/mm,  $p < 0.05$ ; -LogEC50: PVAT+/E- =  $6.6 \pm 0.12$  vs. PVAT+/E- L-NAME =  $7.0 \pm 0.07$ ,  $p < 0.05$ ) but not in abdominal aorta (Rmax: PVAT+/E- =  $10.9 \pm 0.1$  vs. PVAT+/E- L-NAME =  $11.6 \pm 0.4$  mN/mm,  $p > 0.05$ ; -LogEC50: PVAT+/E- =  $6.7 \pm 0.15$  vs. PVAT+/E- L-NAME =  $6.9 \pm 0.08$ ,  $p > 0.05$ ; **Figure 2C**).

### ROS Production and Lipid Peroxidation Did Not Vary along the Aorta

ROS production was detected based on DHE fluorescence (**Figure 3A**), and lipid peroxidation was evaluated based on the expression of 4-HNE adducts (**Figure 3B**). ROS production was almost fully inhibited by MnTMPyP in abdominal and thoracic aorta, suggesting superoxide as the main ROS evaluated *in situ* by DHE fluorescence in both the vascular wall and PVAT (**Figure 3A**). Both ROS production and lipid peroxidation were similar in abdominal and thoracic aortic tissues and PVAT (**Figures 3A,B**).

### Anti-Oxidative Profiles of Abdominal and Thoracic Aortic Tissue and PVAT

The protein expression levels of SOD isoforms were investigated in abdominal and thoracic tissues. EC-SOD did not differ between abdominal and thoracic aortic tissues and PVAT

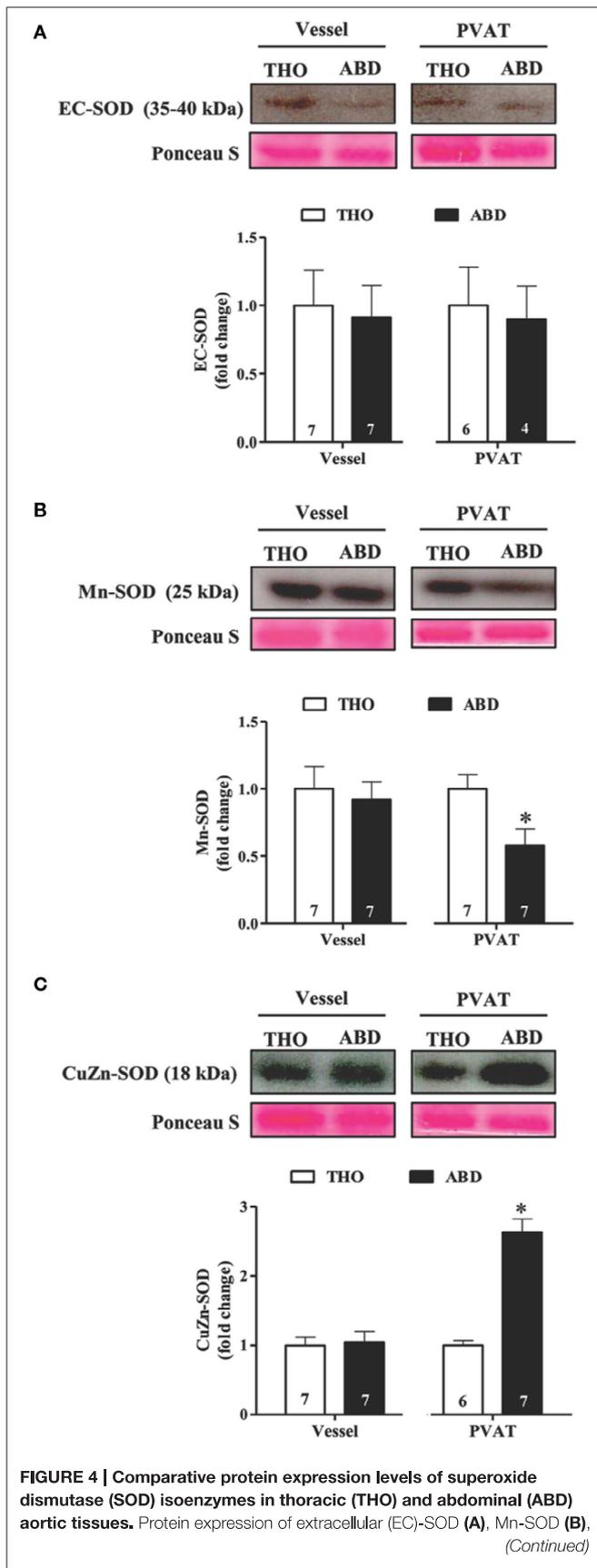
(**Figure 4A**), while reduced Mn-SOD expression was detected in abdominal compared with thoracic PVAT, without changes in the vascular wall (**Figure 4B**). In contrast, CuZn-SOD expression was increased in abdominal PVAT compared to thoracic PVAT, with no regional differences in the aortic wall (**Figure 4C**).

## DISCUSSION

The present results showed that: (1) the anti-contractile effect of PVAT on alpha-adrenergic-induced contraction observed in thoracic aorta is completely lost in the abdominal section, (2) there is a significant reduction in eNOS-derived NO production in PVAT but not in the endothelium of the abdominal vs. the thoracic aorta, and (3) ROS production and lipid peroxidation levels appear to be similar along the aorta, although the relative expression levels of SOD isoforms are different. Therefore, a minor contribution of NO in the abdominal vs. the thoracic adipose depot, rather than changes in redox status, might be involved in the functional regional differences along the aorta.

Anti-contractile effects of murine thoracic periaortic fat have been demonstrated in response to several contractile agonists, including phenylephrine, serotonin and angiotensin II (Löhn et al., 2002; Fésus et al., 2007; Gao et al., 2007; Lee et al., 2011; Sun et al., 2013; Araujo et al., 2015). Importantly, the endothelium contributes to the anti-contractile effect of PVAT in the response to angiotensin II (Gálvez-Prieto et al., 2012), while it only attenuates or does not alter its effect on the alpha-adrenergic mediated contraction in the thoracic aorta (Gao et al., 2007; Lee et al., 2009, 2011). In agreement with these data, both endothelium and PVAT, independently of each other, restrain the contractile response to phenylephrine in the thoracic aorta. In contrast, in the abdominal aorta, only the endothelium exerted an anti-contractile effect in the phenylephrine-induced contraction. These data are consistent with previous data demonstrating anti-contractile effects of endothelium-derived NO in both thoracic and abdominal aortic tissues (Kleinbongard et al., 2013), while the anti-contractile function of periaortic fat on the angiotensin II-induced contraction is impaired in the abdominal section (Watts et al., 2011).

Although the contractile response to phenylephrine varies along the aorta, endothelium-dependent relaxation levels induced by acetylcholine were similar in abdominal and thoracic aorta. Similar relaxation responses to acetylcholine were also observed in abdominal vs. thoracic sections of aorta in male Sprague-Dawley rats (Oloyo et al., 2012). In addition, PVAT did not play a role in the aortic relaxation response to acetylcholine, as previously demonstrated (Ketonen et al., 2010; Gálvez-Prieto et al., 2012).



**FIGURE 4 | Continued**  
and cytoplasmic CuZn-SOD (C) in vessel walls and perivascular adipose tissue (PVAT) from THO and ABD aorta. Representative blots and Ponceau S staining were demonstrated at the upper panels of the figures and densitometric analysis is expressed as the fold change of THO expression at the bottom panel. Data are expressed as the means  $\pm$  SEM; the number of animals is indicated in the bars of the graph. Student's *t*-test, *P* < 0.05; \*ABD vs. THO PVAT.

NO availability using DAF-2 fluorescence was previously demonstrated in PVAT of mouse mesenteric arteries (Gil-Ortega et al., 2010) and thoracic aorta (Xia et al., 2016). Here, for the first time, we demonstrated that NO availability in PVAT was significantly reduced in abdominal vs. thoracic aorta, whereas endothelium-derived NO levels were similar between the two portions of the aorta. The reduction in DAF-2 fluorescence in the abdominal periaortic fat was accompanied by a similar magnitude of reduction in eNOS expression in this tissue, while eNOS expression in the endothelium remained the same along the aorta. Reinforcing these results, it is interesting to observe that in PVAT preserved but endothelium denuded abdominal aortic rings the inhibition of NO synthesis did not change the phenylephrine-induced contraction, while it was increased in thoracic aortic rings. The cell-specific localization of the higher eNOS protein expression in thoracic aortic PVAT remains to be elucidated. Because microvessels are present throughout the thoracic PVAT, we cannot rule out endothelial cells from these vessels as a source of NO in PVAT, albeit the vast majority of eNOS positive cells in PVAT are adipocytes (Xia et al., 2016).

It is known that the abdominal aorta exhibits a different PVAT phenotype compared to the thoracic aorta: while abdominal PVAT exhibits a phenotype of pro-inflammatory fat, thoracic periaortic fat shares characteristics of BAT (Padilla et al., 2013). Interestingly, enlargement of lipid droplet morphology has been observed in thoracic periaortic fat from obese mice (Fitzgibbons et al., 2011). This change in phenotype induced by a high-fat diet is accompanied by a significant reduction in PVAT-derived NO production related to decreased eNOS phosphorylation (Xia et al., 2016). However, aerobic exercise training can overbrowning and enhances the eNOS expression in thoracic PVAT (Araujo et al., 2015). These studies support the hypothesis that physiological white fat depots surrounding the abdominal aorta may not exhibit a significant anti-contractile function due to less pronounced eNOS expression and NO production and/availability.

In the absence of PVAT and endothelium, abdominal and thoracic portions of the aorta exhibit similar raw forces in response to phenylephrine, suggesting both as major mechanisms involved in the regional contractile differences along the aorta. However, we cannot exclude other intrinsic factors. Although contraction in response to phenylephrine of rat abdominal and thoracic aorta is mediated via alpha1D-adrenergic receptor subtype (Asbún-Bojalil et al., 2002), prostanoids derived from smooth muscle cells contribute to contraction only in the abdominal aorta (Lamb et al., 1994). In addition, distal aortic segments are stiffer than proximal ones (Sokolis et al., 2008; Devos et al., 2015), although the mechanisms underlying this

regional difference within the aorta is not fully established. Previous study has shown that impairment of eNOS activity is an important mechanism inducing vascular extracellular matrix remodeling in a model of abdominal aortic aneurism (Gao et al., 2012). Therefore, the substantial reduction in NO availability observed in the present study at the abdominal aorta might be a relevant factor implicated in the susceptibility of this part of the aorta to vascular injury.

It is well-known that NO availability is impaired by the spontaneous reaction of NO with superoxide anion causing the generation of peroxynitrite, a potent oxidant with potential cytotoxicity. Gil-Ortega et al. (2014) demonstrated that an enhanced superoxide generation in PVAT surrounding mesenteric arteries of obese mice is associated with a loss of the anti-contractile effect of PVAT on the contractile response of mesenteric arteries to noradrenaline. Therefore, we attempted to investigate whether oxidative differences along the aorta could be involved in the impaired anti-contractile function and NO availability noted in the abdominal aorta. Interestingly, no regional differences were noted in either superoxide generation, based on DHE fluorescence, or lipid peroxidation, assessed based on the presence of 4-HNE-protein adducts between the vascular wall and PVAT of abdominal and thoracic portions of the aorta. Early dysfunction of thoracic aortic PVAT was associated with increased lipid peroxidation, evaluated based on the presence of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), in response to high fructose diet (Rebolledo et al., 2010). However, this change reflected those reported in abdominal adipose depots (Alzamendi et al., 2009), suggesting that they are the consequence of general rather than local oxidative stress involved in the PVAT control of vascular function.

The major enzymatic control of superoxide anion levels in the vessel wall is exerted by SOD isoforms (Faraci and Didion, 2004). SOD activity was also detected in PVAT of murine mesenteric arteries and thoracic aorta, playing an important role in the redox status of vascular wall (Rebolledo et al., 2010; Gil-Ortega et al., 2014). SODs convert superoxide anion into hydrogen peroxide, thereby protecting NO availability and signaling. Although the three isoforms of SOD catalyze the same reaction, they differ in both localization and their importance for vascular function. Here, we noted similar patterns of SOD expression between the abdominal and thoracic aortic walls. However, in comparison

with the thoracic PVAT, abdominal PVAT exhibited reduced protein levels of Mn-SOD and enhanced cytosolic CuZn-SOD. Interestingly, CuZn-SOD overexpression protects the aorta from lipid peroxidation and DNA fragmentation, whereas Mn-SOD heterozygous-deficient mice exhibited enhanced aortic lipid peroxidation and apoptosis, mechanisms of importance for the development of atherosclerosis (Guo et al., 2001). However, the functional significance of differences in vascular expression or activity in PVAT is still poorly understood; future studies will be necessary to address this question.

Taken together, the present results demonstrate that, compared with the thoracic aorta, the anti-contractile function of PVAT is impaired in the abdominal portion of the aorta through a reduction in eNOS-derived NO production without changes in ROS generation and lipid peroxidation. Knowing that aortic atherosclerotic lesions and aneurysms are predominant in abdominal rather than thoracic portions of the aorta, these findings highlight a new specific regional role of PVAT depots in the control of vascular function that may drive differences in susceptibility to vascular injury between these two portions of the aorta.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the study: LR, AD. Performed the experiments: JV, MF. Analyzed and interpreted the data: JV, MF, LR, AD. Wrote the manuscript: JV, MF, LR, AD.

## FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 14/07947-6 and 14/20303-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grant #447507/2014-1). AD and LR are research fellows from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Gisele K. Couto for the excellent technical assistance in the experiments evaluating DAF-2 and DHE fluorescence.

## REFERENCES

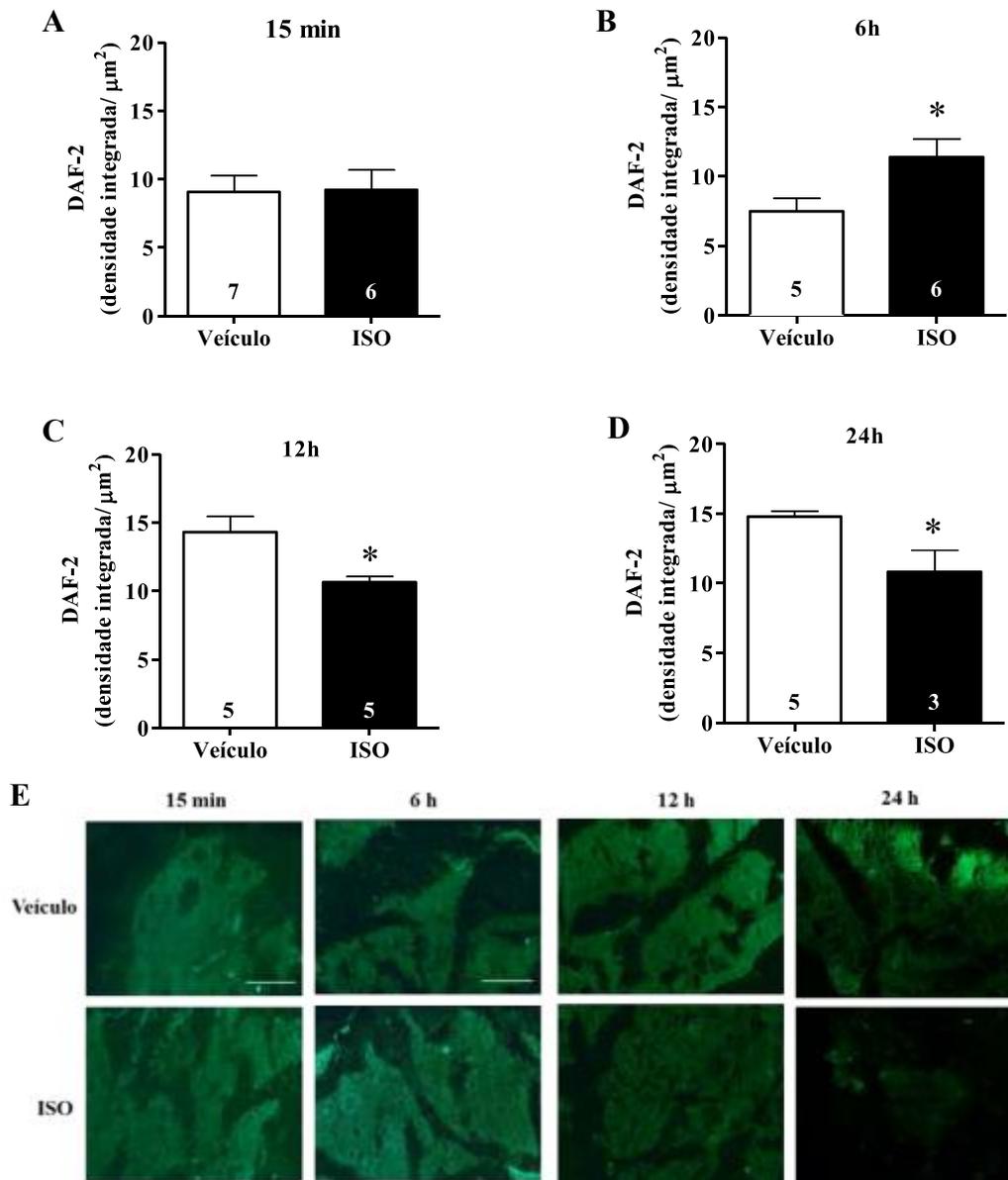
- Alzamendi, A., Giovambattista, A., Raschia, A., Madrid, V., Gaillard, R. C., Rebolledo, O., et al. (2009). Fructose-rich diet-induced abdominal adipose tissue endocrine dysfunction in normal male rats. *Endocrine* 35, 227–232. doi: 10.1007/s12020-008-9143-1
- Araujo, H. N., Valgas da Silva, C. P., Sponton, A. C., Clerici, S. P., Davel, A. P., Antunes, E., et al. (2015). Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. *Life Sci.* 125, 79–87. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.032
- Asbún-Bojalil, J., Castillo, E. F., Escalante, B. A., and Castillo, C. (2002). Does segmental difference in alpha 1-adrenoceptor subtype explain contractile difference in rat abdominal and thoracic aortae? *Vascul. Pharmacol.* 38, 169–175. doi: 10.1016/S1537-1891(02)00164-7
- Chatterjee, T. K., Stoll, L. L., Denning, G. M., Harrelson, A., Blomkalns, A. L., Idelman, G., et al. (2009). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ. Res.* 104, 541–549. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182998
- Davel, A. P., Fukuda, L. E., De Sa, L. L., Munhoz, C. D., Scavone, C., Sanz-Rosa, D., et al. (2008). Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H211–H219. doi: 10.1152/ajpheart.00581.2007
- Davel, A. P., Kawamoto, E. M., Scavone, C., Vassallo, D. V., and Rossoni, L. V. (2006). Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. *Br. J. Pharmacol.* 148, 629–639. doi: 10.1038/sj.bjp.0706749
- Devos, D. G., Rietzschel, E., Heyse, C., Vandemaele, P., Van Bortel, L., Babin, D., et al. (2015). MR pulse wave velocity increases with age faster in the thoracic

- aorta than in the abdominal aorta. *J. Magn. Reson. Imaging* 41, 765–772. doi: 10.1002/jmri.24592
- Fang, L., Zhao, J., Chen, Y., Ma, T., Xu, G., Tang, C., et al. (2009). Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J. Hypertens.* 27, 2174–2185. doi: 10.1097/HJH.0b013e328330a900
- Faraci, F. M., and Didion, S. P. (2004). Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1367–1373. doi: 10.1161/01.ATV.0000133604.20182.cf
- Fésus, G., Dubrovská, G., Gorzelniak, K., Kluge, R., Huang, Y., Luft, F. C., et al. (2007). Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardio Resear.* 75, 719–727. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.05.025
- Fitzgibbons, T. P., Kogan, S., Aouadi, M., Hendricks, G. M., Straubhaar, J., and Czech, M. P. (2011). Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissue and their resistance to diet-induced inflammation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1425–H1437. doi: 10.1152/ajpheart.00376.2011
- Gálvez-Prieto, B., Somoza, B., Gil-Ortega, M., García-Prieto, C. F., de Las Heras, A. I., González, M. C., et al. (2012). Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. *Front. Pharmacol.* 3:103. doi: 10.3389/fphar.2012.00103
- Gao, L., Siu, K. L., Chalupsky, K., Nguyen, A., Chen, P., Weintraub, N. L., et al. (2012). Role of uncoupled endothelial nitric oxide synthase in abdominal aortic aneurysm formation: treatment with folic acid. *Hypertension* 59, 158–166. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.181644
- Gao, Y. J., Lu, C., Su, L. Y., Sharma, A. M., and Lee, R. M. (2007). Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br. J. Pharmacol.* 151, 323–331. doi: 10.1038/sj.bjp.0707228
- Gil-Ortega, M., Condezo-Hoyos, L., García-Prieto, C. F., Arribas, S. M., González, M. C., Arangué, I., et al. (2014). Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS ONE* 9:e95312. doi: 10.1371/journal.pone.0095312
- Gil-Ortega, M., Stucchi, P., Guzmán-Ruiz, R., Cano, V., Arribas, S., González, M. C., et al. (2010). Adaptive nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. *Endocrinology* 151, 3299–3306. doi: 10.1210/en.2009-1464
- Guo, Z., Van Remmen, H., Yang, H., Chen, X., Mele, J., Vijg, J., et al. (2001). Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1131–1138. doi: 10.1161/hq0701.092092
- Ketonen, J., Shi, J., Martonen, E., and Mervaala, E. (2010). Periaortic adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ. J.* 74, 1479–1487. doi: 10.1253/circj.CJ-09-0661
- Kleinbongard, P., Schleiger, A., and Heusch, G. (2013). Characterization of vasomotor responses in different vascular territories of C57Bl/6 mice. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 238, 1180–1191. doi: 10.1177/1535370213502621
- Lamb, V. L., Schwartz, A. J., Rohn, W. R., and Kaiser, L. (1994). Cyclooxygenase inhibitors depress norepinephrine constriction of rat abdominal, but not thoracic, aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 256, 221–226. doi: 10.1016/0014-2999(94)90250-X
- Lee, R. M., Bader, M., Alenina, N., Santos, R. A., Gao, Y. J., and Lu, C. (2011). Mas receptors in modulating relaxation induced by perivascular adipose tissue. *Life Sci.* 89, 467–472. doi: 10.1016/j.lfs.2011.07.016
- Lee, R. M., Lu, C., Su, L. Y., and Gao, Y. J. (2009). Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J. Hypertens.* 27, 782–790. doi: 10.1097/HJH.0b013e328324ed86
- Löhn, M., Dubrovská, G., Lauterbach, B., Luft, F. C., Gollasch, M., and Sharma, A. M. (2002). Periaortic fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J.* 16, 1057–1063. doi: 10.1096/fj.02-0024.com
- Oloyo, A. K., Elias, S. O., and Sofola, O. A. (2012). Differential responses to endothelial-dependent relaxation of the thoracic and abdominal aorta from male Sprague-Dawley rats. *Niger. J. Physiol. Sci.* 27, 117–122.
- Oriowo, M. A. (2015). Perivascular adipose tissue, vascular reactivity and hypertension. *Med. Princ. Pract.* 24, 29–37. doi: 10.1159/000356380
- Padilla, J., Jenkins, N. T., Vieira-Potter, V. J., and Laughlin, M. H. (2013). Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R543–R552. doi: 10.1152/ajpregu.00567.2012
- Police, S. B., Thatcher, S. E., Charnigo, R., Daugherty, A., and Cassis, L. A. (2009). Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1458–1464. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.192658
- Rebolledo, A., Rebolledo, O. R., Marra, C. A., García, M. E., Roldán Palomo, A. R., Rimorini, L., et al. (2010). Gagliardino JJ. Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue. *Cardiovasc. Diabetol.* 9, 65. doi: 10.1186/1475-2840-9-65
- Schleifenbaum, J., Köhn, C., Voblova, N., Dubrovská, G., Zavarinskaya, O., Gloe, T., et al. (2010). Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. *J. Hypertens.* 28, 1875–1882. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833c20d5
- Sokolis, D. P., Boudoulas, H., and Karayannacos, P. E. (2008). Segmental differences of aortic function and composition: clinical implications. *Hellenic J. Cardiol.* 49, 145–154.
- Sun, X., Hou, N., Han, F., Guo, Y., Hui, Z., Du, G., et al. (2013). Effect of high free fatty acids on the anti-contractile response of perivascular adipose tissue in rat aorta. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 63, 169–174. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.07.018
- Szasz, T., and Webb, R. C. (2012). Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin. Sci. (Lond)* 122, 1–12. doi: 10.1042/CS20110151
- Tsamis, A., Krawiec, J. T., and Vorp, D. A. (2013). Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *J. R. Soc. Interface* 10:20121004. doi: 10.1098/rsif.2012.1004
- Watts, S. W., Shaw, S., Burnett, R., and Dorrance, A. M. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase in periaortic fat: mechanisms of inhibition of contraction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H1236–H1247. doi: 10.1152/ajpheart.00384.2011
- Xia, N., Horke, S., Habermeier, A., Closs, E. I., Reifensberg, G., Gericke, A., et al. (2016). Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in perivascular adipose tissue of diet-induced obese mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 78–85. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306263

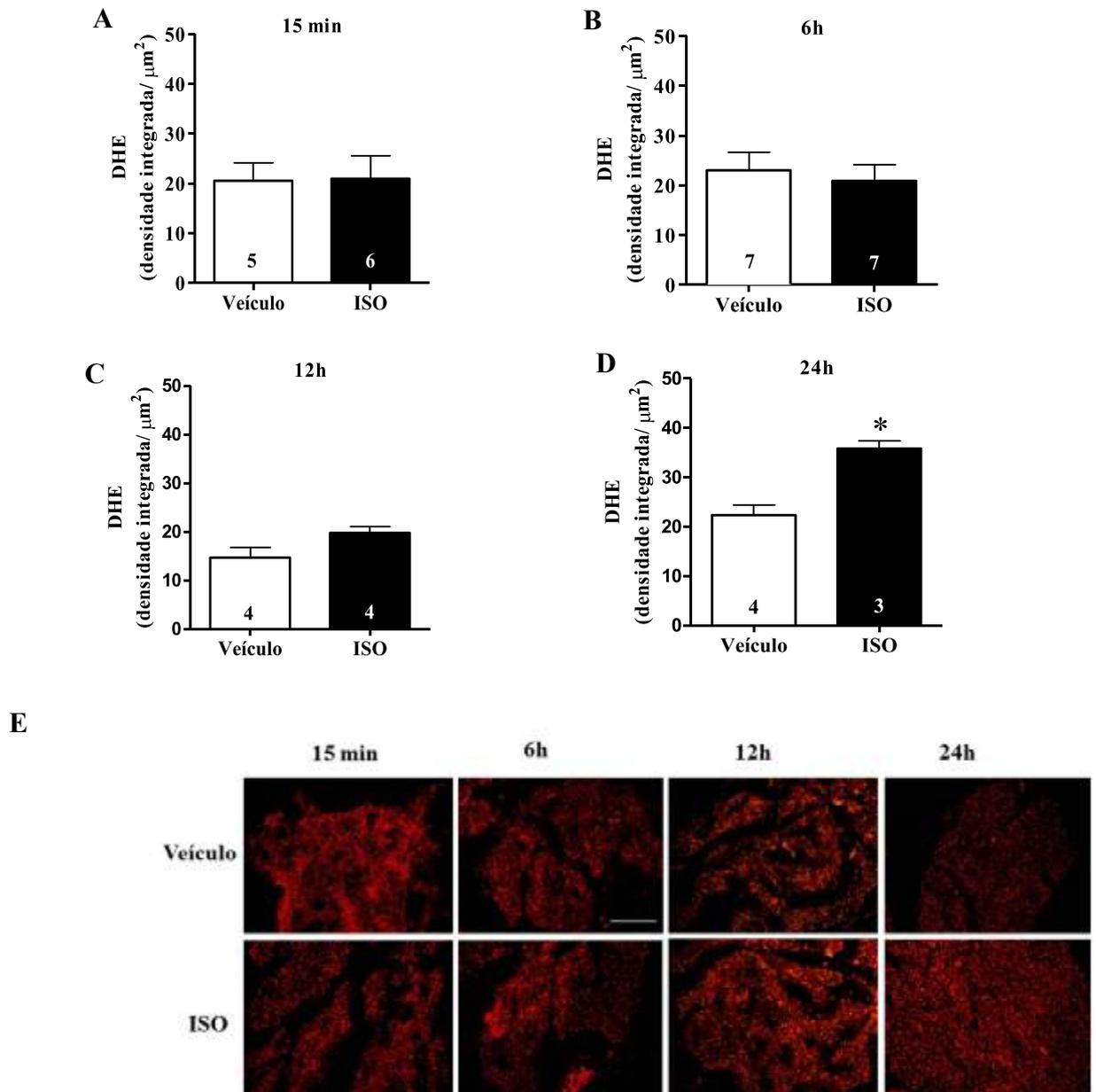
**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Victorio, Fontes, Rossoni and Davel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Anexo D – Avaliação da produção de NO e EROs no PVAT aórtico de animais eutanasiados entre 18-20h.



**Figura Anexo D1.** Avaliação da produção de NO pela fluorescência a diaminofluoreceína (DAF) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição *in situ* com isoproterenol (ISO; 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 15 min (A), 6 h (B), 12h (C) e 24h (D). As barras representam média  $\pm$  EPM. O número (n) de animais está indicado dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. veículo. Imagens representativas de DAF (10X) estão apresentadas em E. Barra branca = 50  $\mu\text{m}$



**Figura Anexo D2.** Avaliação da produção de EROs pela fluorescência a dihidroetidina (DHE) no tecido adiposo perivascular (PVAT) da aorta torácica em resposta à exposição *in situ* com isoproterenol (ISO; 1  $\mu\text{M}$ ) ou veículo por 15 min (A), 6 h (B), 12h (C) e 24h (D). As barras representam média  $\pm$  EPM. O número (n) de animais está indicado dentro das barras. Teste *t* de Student: \* $P < 0,05$  vs. veículo. Imagens representativas de DHE (10X) estão apresentadas em E. Barra branca = 50  $\mu\text{m}$ .

## ANEXO E



CEUA/Unicamp

---

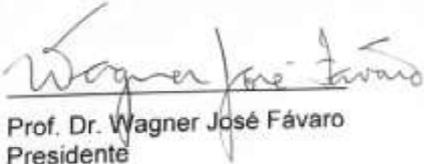
Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Possível interação entre estimulação Beta-adrenérgica e ativação do receptor de mineralocorticoide em células endoteliais, musculares lisas e do tecido adiposo perivascular** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **3523-1(A)/2017**), de responsabilidade da **Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel** e **Jamaira Aparecida Victorio**, teve o título alterado para **Estudo dos efeitos da hiperativação dos receptores beta-adrenérgicos no tecido adiposo perivascular da aorta torácica de ratos**.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 10/08/2017.

Campinas, 23 de janeiro de 2017.

  
Prof. Dr. Wagner José Fávaro  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

## ANEXO F



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Possível interação entre estimulação Beta-adrenérgica e ativação do receptor de mineralocorticoide em células endoteliais, musculares lisas e do tecido adiposo perivascular**, registrada com o nº **3523-1(A)/2017**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel** e **Jamaira Aparecida Victório**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **1º. de agosto de 2017**.

Finalidade:	( ) Ensino                      ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/03/2014-15/03/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/08/2017-15/03/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	160
Idade / Peso:	30 dias / 60g
Sexo:	Machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 10 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Wagner José Fávares  
Presidente

Fátima Alónso  
Secretária Executiva

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

**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 **ESTUDO DOS EFEITOS DA HIPERATIVAÇÃO DOS RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS NO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR DA AORTA TORÁCICA DE RATOS**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 22 de março de 2018

Assinatura : Jamaíra Ap. Victório  
Nome do(a) autor(a): **Jamaíra Aparecida Victório**  
RG n.º 40598564-2

Assinatura : cpal.  
Nome do(a) orientador(a): **Ana Paula Couto Davel**  
RG n.º 1326305