
CIÊNCIAS DA MOTRICIDADE – BIODINÂMICA DA MOTRICIDADE HUMANA

HYGOR NUNES ARAUJO

**PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM AORTA DE RATOS
TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Rio Claro-SP

2015





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUISTA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



HYGOR NUNES ARAUJO

**PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM AORTA DE RATOS
TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Angelina Zanesco

Co-orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Andréia Delbin

Rio Claro-SP

2015

HYGOR NUNES ARAUJO

**PAPEL DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR EM AORTA DE RATOS
TREINADOS E ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Motricidade.

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Maria Andréia Delbin

Prof.^o Dr.^o Alexandre Gabarra de Oliveira

Prof.^o Dr.^o Antonio Celso Saragossa Ramos Filho

Rio Claro-SP, 24 de Março de 2015.

Dedico este trabalho à minha família; sempre ao meu lado, por mais distante que tivessem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me guiado e permitido estar nos melhores lugares, com as melhores pessoas, desfrutando os melhores momentos.

Agradeço a Dr.^a. Angelina Zanesco por te me dado oportunidade de fazer e estar entre os melhores me acolhendo em seu laboratório e me orientando durante o mestrado.

Agradeço a Dr.^a. Maria Andréia Delbin, pelo tempo, paciência, dedicação e comprometimento com este projeto. Fui o mais afortunado entre os pós-graduandos; imaginei ter uma boa orientadora; para minha felicidade, pude contar com duas excelentes PROFESSORAS, para mim, o mais importante e alto título dado a uma pessoa. Profissionalmente, contar com a professora Dr.^a Maria Andréia, a co-orientadora, foi fundamental. Para minha vida pessoal, conhecer Maria Andréia Delbin, o ser humano, foi um privilégio. Muito obrigado PROFESSORA Maria Andréia, por ser uma “GIGANTE”.

Aos meus companheiros de laboratório em Rio Claro, Carlos Sponton, Guilherme Puga, Iane Novais, Chadi Anaruma, Maycon Ferreira, também deixo meu muito obrigado, contribuíram em meu desenvolvimento acadêmico com discussões e debates em reuniões.

À Aline Pincerato Jarrete “de Moraes”, devo mais que um agradecimento; mais que companheira de laboratório, uma amiga; inteligente, comprometida, dedicada, competente, perfeccionista, delicada, atenciosa, centrada, sensata, muito, mas muito bem humorada e modesta; chega a ser impressionante a quantidade de qualidade que ela conseguiu reunir em seus 24 anos de vida. Acreditem, se não a conhecem, vale a pena conhecer, é a pessoa ideal para ter ao lado em tempos de “calmas chuvas ou estrondosas trovoadas”.

Agradeço também a Carmem Valgas e Amanda Sponton; as mais perfeitas parceiras e colaboradas que um pós-graduando poderia contar. Excelentes como amigas, inspiradoras como pessoas; registro aqui a admiração e carinho que tenho por vocês.

Jamais deixaria de agradecer meus amigos de laboratório em campinas, Jad Victorio, Dani Guizoni, Andressa Souza, Stefano Piato e Nadia Garcia. A mais animada, bem humorada, competente e prestativa equipe de um laboratório que tive o prazer de conhecer. Obrigado por fazer destes dois últimos anos inesquecíveis.

Agradeço aos professores doutores, Edson Antunes, Camila de Moraes, Ana Paula Davel, por disponibilizar a infraestrutura e suas indispensáveis contribuições intelectuais.

Agradeço ainda a melhor secretaria da pós-graduação de toda UNESP, Ivana Brandt, pelo profissionalismo e paciência que teve durante estes três últimos anos.

Não posso deixar de agradecer meus amigos da época de colegial, Raony e Aline, e também meus amigos da graduação, Maurício Santini e Gustavo de França.

Agradeço as pessoas que inspiram e me ensinaram o que é o amor. Ao meu pai, por ter dedicado sua vida à família, um homem que me inspira, meu porto seguro, meu guardião, meu herói. A minha mãe, a mais “perfeita” das mães: justa, sábia, irritantemente verdadeira, centrada, decidida, enérgica, o único ser vivo que consegue me fazer enxergar um possível “doce futuro pessimista” com olhos “verdadeiramente otimistas”. Aos meus irmãos, Hugo e Rebeca, os mais doces dos irmãos; alegro-me muito, pois tive a sorte de tê-los ao meu lado em minha infância e adolescência, vocês foram fundamentais no meu amadurecimento. No entanto não pude retribuir a você tudo que me proporcionaram, estive distante na “complicada fase da adolescência” e não pude desempenhar meu papel de irmão mais velho, porém, sempre orei por vocês, acredito que não foi em vão, vocês se tornaram excelentes pessoas. Vocês quatro, pai, mãe, Hugo e Rebeca são meu norte. Amo vocês.

Agradeço a CAPES e FAPESP pelo financiamento do projeto.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei em ombros de gigantes”.

Isaac Newton

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

1.0 Mecanismo de ação do óxido nítrico.....	20
2.0 Mecanismo de contração do músculo liso vascular.....	22
3.0 Tecido adiposo perivascular	23
4.0 Ação paracrina do tecido adiposo perivascular no músculo liso vascular.....	24
5.0 Desenho experimental	29
6.0 Teste de exaustão: valores iniciais de velocidade máxima, tempo e distância.....	34
7.0 Teste de exaustão: valores finais de velocidade máxima, tempo e distância.....	35
8.0 Peso corporal e gordura epididimal.....	36
9.0 Peso do tecido adiposo perivascular.....	38
10.0 Curvas concentração-resposta à acetilcolina.....	40
11.0 Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio.....	41
12.0 Curvas concentração-resposta à fenilefrina.....	43
13.0 Curvas concentração-resposta à serotonina	45
14.0 Expressão das enzimas eNOS em aorta e iNOS no tecido adiposo perivascular.....	47

Tabelas

1.0 Colesterol total, triglicerídeos, glicose, insulina e leptina de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).....	37
2.0 Valores de resposta contrátil produzida pelo KCl 80 mM (Δ KCl) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).....	38
3.0 Valores de resposta contrátil produzida pela fenilefrina (Δ PHE) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).....	39
4.0 Valores de potência (pEC_{50}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário	

(c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).....	42
5.0 Valores de potência (pEC ₅₀) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE) e serotonina (5-HT) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos experimentais: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

·OH - Radical hidroxila
5-HT – 5-hidroxitriptofano
ACh – Acetilcolina
ADRF - Fatores relaxantes derivados dos adipócitos
Akt - Serina/treonina quinase
ANG II - Angiotensina II
ATP - Trifosfato de adenosina
Ca²⁺ - Íon Cálcio
CaCl₂·2H₂O - Cloreto de Cálcio di-hidratado
CAT - Catalase
CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CEUA – Comissão de ética em estudos
cNOS - Sintase de óxido nítrico constitutivas
c-SD – Grupo controle sedentário
CT – Colesterol total
c-TR – Grupo controle Treinado
Cu/Zn-SOD - Superoxido dismutase citosólico
DAG - Diacilglicerol
dh-SD – Grupo dieta hiperlipídica Sedentário
dh-TR – Grupo dieta hiperlipídica Treinado
EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
E_{MÁX} – Resposta máxima
eNOS – sintase endotelial do óxido nítrico
ERK - Quinase regulada por sinalização extracelular
EROS – Espécies reativas de oxigênio
Ex-SOD - Superóxido dismutase extracelular
FCM – Faculdade de Ciências Médicas
GCs - Guanilato ciclase solúvel
GMPc - Monofosfato de Guanosina cíclico
GSH-Px - Glutathione peroxidase
GTP - Trifosfato de Guanosina
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
H₂S - Peróxido de Sulfeto
HSL- Lipase hormônio sensível
IB – Instituto de Biologia
iNOS - sintase induzível do óxido nítrico
IL - Interleucina
IP₃ - Inositol-1,4,5-trifosfato
K⁺ - Íon Potássio
KCl - Cloreto de Potássio
kg – quilograma
KH₂PO₄ - Fosfato de potássio monobásico

LPL - Lipoproteína lipase
MCP-1 – Proteínas de quimoatração de monócitos
MgSO₄.7H₂O - Sulfato de magnésio hepta-hidratado
ml – Mililitro
mm – Milímetro
mN – Milinewton
Mn-SOD - Superóxido dismutase mitocondrial
NaCl - Cloreto de Sódio
NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio
nNOS - Sintase de óxido nítrico neuronal
NO – Óxido nítrico
NO₂⁻ – Nitrito
NO₃⁻ – Nitrato
NOS - Sintase de óxido nítrico
NO_x⁻ – Nitrito e Nitrato
O₂⁻ - Ânion superóxido
ONOO⁻ - Peroxinitrito
PAII - Inibidor de ativador de plasminogênio 1
pEC₅₀ – Potência
PGI₂ - Prostaciclina
PGH₂ - Prostaglandina H2
Phe – Fenilefrina
PKC - Proteína quinase C
PPAR-γ - Coativador do receptor gama ativado por peroxissoma proliferador
PVAT- – Anéis de aorta com ausência de tecido adiposo perivascular
PVAT – Tecido adiposo perivascular
PVAT+ – Anéis de aorta com presença de tecido adiposo perivascular
SNP – Nitroprussiato de sódio
SOD - Superóxido dismutase
Src - Proteína tirosina quinase
TAB - Tecido adiposo branco
TAM - Tecido adiposo marrom
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG – Triglicérides
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TR – Treinamento físico aeróbio
TXA2 - Tromboxano A2
UCP1 - Proteína desacopladora 1
UNESP – Universidade Estadual Paulista
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1.0 Introdução	16
2.0 Revisão de literatura	18
2.1 Célula endotelial.....	18
2.2 Célula muscular lisa vascular.....	21
2.3 Tecido adiposo perivascular	22
2.4 Exercício físico aeróbio	24
3.0 Objetivo geral	27
4.0 Materiais e métodos	28
4.1 Aspectos éticos.....	28
4.2 Animais	28
4.3 Desenho experimental.....	28
4.4 Peso corporal e consumo alimentar.....	29
4.5 Programa de treinamento físico	30
4.5.1 Adaptação e determinação da intensidade do treinamento	30
4.5.2 Programa de treinamento físico	30
4.6 Medidas de Glicemia.....	31
4.7 Obtenção das amostras de plasma, soro, aorta e tecido adiposo perivascular	31
4.8 Curvas concentração-resposta em anéis de aorta.....	31
4.9 Determinação de fatores bioquímicos séricos e plasmáticos.....	32
4.10 Determinação da expressão de proteínas.....	32
4.11 Análises estatísticas	33
5.0 Resultados	34
5.1 Determinação da velocidade do treinamento físico aeróbio	34
5.2 Eficácia do treinamento físico aeróbio	34
5.3 Peso corporal, gordura epididimal e fatores bioquímicos.....	35
5.4 Reatividade vascular	38
5.4.1 Caracterização dos anéis	38
5.4.2 Curvas de relaxamento	39
5.4.3 Curvas de contração	42
5.5 Expressão de proteínas	46
6.0 Discussão	48
7.0 Conclusão	54
8.0 Sumário de resultados	54
9.0 Referências	55
10.0 Anexo	71

RESUMO

Adicional à relevância do endotélio, o tecido adiposo perivascular (PVAT) desempenha importante papel no controle do sistema cardiovascular e endócrino-metabólico, é responsável por liberar uma grande variedade de substâncias que podem modular a vasomotricidade. O objetivo do presente estudo foi verificar o papel do tecido adiposo perivascular em aorta de ratos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica. Ratos *Wistar* (290-320 g) foram divididos em: Sedentário (c-SD), Sedentário Dieta Hiperlipídica (dh-SD), Treinado (c-TR) e Treinado Dieta Hiperlipídica (dh-TR). Pelo período de dezesseis semanas os grupos c-SD e c-TR receberam ração balanceada e os grupos dh-SD e dh-TR receberam dieta hiperlipídica. Após a oitava semana, apenas os grupos treinados iniciaram o treinamento físico aeróbico (TR) em esteira, 5 dias/semana, 60 min por sessão (10 min a 40% da velocidade máxima, 40 min a 50-60% da velocidade máxima e 10 min a 40% da velocidade máxima) e 0% de inclinação, até o final do protocolo total. Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (SNP), fenilefrina (PHE) e serotonina (5-HT) foram obtidas em anéis de aorta torácica na ausência (PVAT-) e na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular. As concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), insulina e leptina, foram avaliadas. Foram determinadas as expressões das proteínas: sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) na aorta e sintase induzível do óxido nítrico (iNOS) no PVAT. A dieta hiperlipídica promoveu maior ganho de peso corporal e gordura epididimal, bem como aumento nos valores de TG, insulina e leptina no grupo dh-SD comparado aos grupos c-SD, enquanto que o TR reduziu estes valores no grupo dh-TR. Respostas Relaxantes: a potência (pEC_{50}) e a resposta máxima (E_{MAX}) aos agentes ACh e SNP não foram alteradas em todos os grupos, tanto para PVAT- ou PVAT+. Respostas Contráteis: O PVAT promoveu redução da E_{MAX} à PHE (mN/mm) em todos os grupos: c-SD (PVAT+: $3,5 \pm 0,4$ e PVAT-: $6,6 \pm 0,5$), c-TR (PVAT+: $4,7 \pm 0,8$ e PVAT-: $7,9 \pm 1,4$), dh-SD (PVAT+: $2,1 \pm 0,2$ e PVAT-: $6,1 \pm 0,6$) e dh-TR (PVAT+: $2,5 \pm 0,4$ e PVAT-: $5,8 \pm 0,5$). Nenhuma diferença foi observada nos valores delta de redução à E_{MAX} promovida pela presença do PVAT entre os grupos. A redução da E_{MAX} foi similarmente observada à 5-HT (mN/mm) em anéis PVAT+ para todos os grupos: c-SD (PVAT+: $7,0 \pm 0,9$ e PVAT-: $9,7 \pm 1,3$), c-TR (PVAT+: $7,8 \pm 0,4$ e PVAT-: $10,3 \pm 0,6$), dh-SD (PVAT+: $4,1 \pm 0,1$ e PVAT-: $10,5 \pm 1,2$) e dh-TR (PVAT+: $5,9 \pm 0,7$ e PVAT-: $10,5 \pm 0,9$). O delta de redução da E_{MAX} foi maior no grupo dh-SD ($6,3 \pm 1,5$) quando comparado ao grupo c-SD ($2,7 \pm 0,8$) e o treinamento

físico foi parcialmente eficaz em restabelecer esses valores no grupo dh-TR. Não observamos diferenças para os valores de pEC_{50} para ambos agonistas contráteis. O peso do PVAT foi reduzido no grupo c-TR ($1,88 \pm 0,23$ mg/mm) quando comparado ao grupo c-SD ($2,98 \pm 0,08$ mg/mm). A dieta hiperlipídica aumentou o peso do PVAT no grupo dh-SD ($4,56 \pm 0,33$ mg/mm) e o treinamento reduziu esses valores no grupo dh-TR ($2,40 \pm 0,32$ mg/mm). Observamos aumento nas expressões da eNOS na aorta e iNOS no PVAT apenas no grupo dh-SD comparado aos demais grupos. Concluimos que a dieta hiperlipídica não alterou o efeito anticontrátil do tecido adiposo perivascular à fenilefrina em anéis de aorta. Porém, observamos alteração neste efeito em resposta à serotonina, que foi parcialmente restaurada pelo treinamento físico aeróbio.

Palavras chaves: tecido adiposo perivascular, reatividade vascular, exercício físico aeróbio, dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

The importance of perivascular adipose tissue (PVAT) in vascular function has recently been recognized. The aim of this study was to evaluate the effects of perivascular adipose tissue in the aorta responsiveness from trained rats fed with high fat diet. Male Wistar (290-320 g) rats were divided into: Control sedentary (c-SD), High fat diet sedentary (dh-SD), Trained (c-TR) and High fat diet trained (dh-TR). For sixteen weeks c-SD and c-TR groups were fed with standard chow and dh-SD and dh-TR groups were fed with high fat diet. After eight weeks, c-TR and dh-TR groups initiated the aerobic exercise training on treadmill, 5 days/week, 60 min/session (10 min at 40% of maximum speed, 40 min at 50-60% of maximum speed, and 10 min at 40% of maximum speed) and 0% grade until the end of the protocol. Concentration-response curves to acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (SNP), phenylephrine (PHE) and serotonin (5-HT) were obtained in thoracic aorta without (PVAT-) or with (PVAT +) the PVAT. The concentrations of glucose, total cholesterol (CT), triglycerides (TG), insulin and leptin were evaluated. The protein expressions of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in aorta and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in PVAT were determined. The high fat diet increased the body weight gain, epididymal fat pad, TG, insulin and leptin in dh-SD group compared to c-SD, whereas TR reduced these values in dh-TR group. Relaxing response: The PVAT+ rings did not modify the potency (pEC_{50}) and the maximal response (E_{MAX}) to ACh and SNP agents. Contractile responses: The PVAT reduced the E_{MAX} to PHE (mN/mm) in all groups: c-SD (PVAT+: 3.5 ± 0.4 and PVAT-: 6.8 ± 0.5), c-TR (PVAT+: 4.7 ± 0.8 and PVAT-: 7.9 ± 1.4), dh-SD (PVAT+: 2.1 ± 0.2 and PVAT-: 6.1 ± 0.6) and dh-TR (PVAT+: 2.5 ± 0.4 and PVAT-: 5.8 ± 0.5), in a similar magnitude. We also found an anticontractile effect to 5-HT: c-SD (PVAT+: 7.0 ± 0.9 and PVAT-: 9.7 ± 1.3), c-TR (PVAT+: 7.8 ± 0.4 and PVAT-: 10.3 ± 0.6), dh-SD (PVAT+: 4.1 ± 0.1 and PVAT-: 10.5 ± 1.2) and dh-TR (PVAT+: 5.9 ± 0.7 and PVAT-: 10.5 ± 0.9), however the magnitude of reduction was higher in dh-SD (6.3 ± 1.5) compared to c-SD (2.7 ± 0.8) and exercise training restored the response in dh-TR group. No differences were observed in pEC_{50} for both agonists. The amount of PVAT was markedly reduced in c-TR (1.88 ± 0.23 mg/mm) compared to c-SD (2.98 ± 0.08 mg/mm). The high fat diet increased the amount of PVAT in dh-SD (4.56 ± 0.33 mg/mm) and exercise reduced this value (2.40 ± 0.32 mg/m) in dh-TR group. Increased protein expressions of eNOS in aorta and iNOS in PVAT were observed only in dh-SD group. Our findings show that the high fat diet did not alter the anticontractile effects induced by PVAT to

PHE in rat-isolated aorta. However, enhanced the anticontractile effects to 5-HT and aerobic exercise training prevented this alteration.

Keywords: perivascular adipose tissue, vascular response, aerobic exercise training, high fat diet.

1.0-INTRODUÇÃO

A associação entre sedentarismo e obesidade na gênese das doenças cardiovasculares está bem descrita, porém os mecanismos celulares e moleculares ainda não são totalmente compreendidos. Sendo a obesidade considerada uma doença cardiometabólica ela apresenta um complexo desequilíbrio nos sistemas fisiológicos e consequente comprometimento no funcionamento ideal do sistema cardiovascular em especial nos vasos sanguíneos. Trabalhos que envolvem a indução de obesidade em modelos animais mostram-se úteis nas pesquisas devido a sua grande semelhança com a gênese e as respostas metabólicas decorrentes do sobrepeso/obesidade em humanos (WEST e YORK, 1998; TSCHOP e HEIMAN, 2001). Especificamente, animais da linhagem *Wistar* são utilizados em estudos onde a adiposidade é induzida por dietas, e os resultados mostram aumento nos valores de: peso corporal, gordura epididimal, leptina e triglicérides (ESTADELLA et. al., 2004; DE MORAES et. al., 2007; DE MORAES et. al., 2008; MONTEIRO et. al., 2012), assim a utilização de dieta hiperlipídica tem se mostrado uma ferramenta útil no estudo da obesidade.

O sedentarismo é considerado o quarto maior fator de risco para mortes globais, sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças não-transmissíveis (entre elas: obesidade, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e diabetes mellitus), assim a prática regular de exercício físico tem sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo, sendo uma intervenção importante para saúde da população (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE-OMS, 2010). O exercício físico é capaz de provocar uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais e, em especial no sistema cardiovascular com o objetivo de manter o metabolismo celular (McARDLE et. al., 1998). Sabe-se que o exercício físico aeróbio de moderada intensidade, realizado continuamente, promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares e endócrino-metabólicas (CIOLAC e GUIMARÃES, 2004; ZANESCO e ANTUNES, 2007). Os mecanismos pelos quais o exercício físico de moderada intensidade provoca benefícios cardiovasculares e endócrino-metabólicos envolvem complexos caminhos de sinalização celular e molecular e despertam interesse em diversas linhas de pesquisa.

A integridade das células endoteliais desempenha fundamental papel na manutenção e no controle do tônus vascular, na pressão arterial, função plaquetária, resposta inflamatória, bem como na regulação endócrino-metabólico da musculatura esquelética (ZANESCO e ANTUNES,

2007). Recentemente, estudos demonstraram que, adicional à relevância do endotélio, o tecido adiposo perivascular (PVAT) desempenha importante papel no controle do sistema cardiovascular e endócrino-metabólico (GAO et. al., 2007; AGHAMOHAMMADZADEH et. al., 2012). Até o momento, poucos estudos avaliaram o papel do PVAT associado aos efeitos do treinamento físico e da dieta hiperlipídica, sendo desenvolvidos em artéria coronária circunflexa esquerda de porcos (REIFENBERGER et. al., 2007; BUNKER e LAUGHLIN, 2010). Novos estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de investigar esta importante via de sinalização. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel do tecido adiposo perivascular na reatividade vascular de aorta de ratos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica e os possíveis mecanismos envolvidos nessas alterações.

2.0-REVISÃO DE LITERATURA

2.1-Célula endotelial

Os vasos sanguíneos, usualmente, possuem três camadas: a camada íntima, que está em contato com os elementos do sangue e é essencialmente constituída por células endoteliais, a camada média, composta de células musculares lisas e a camada adventícia, composta de tecido conjuntivo fibroso, que reveste a parte externa do vaso (ZANESCO e DE MORAES, 2013).

O endotélio vascular durante muitos anos foi considerado apenas um conjunto de células homogêneas, relativamente estruturadas e com a única função de revestir internamente os vasos sanguíneos, garantindo uma superfície adequada para a corrente sanguínea. Após estudos pioneiros foi revelada a vasta complexidade das células endoteliais permitindo o detalhamento de suas propriedades funcionais. As células endoteliais desempenham importante função no controle do tônus vascular e sua integridade é fundamental para a manutenção do equilíbrio cardiovascular (NAPOLI e IGNARRO, 2009).

Atualmente, sabe-se que as células endoteliais são responsáveis pela síntese, pelo metabolismo e liberação de grande variedade de mediadores que regulam o tônus vascular, a permeabilidade vascular, o metabolismo de substâncias endógenas e exógenas e a atividade plaquetária e leucocitária (ZANESCO e ANTUNES, 2005). As substâncias produzidas pelo endotélio podem ser divididas entre agentes vasodilatadores como: prostaciclina (PGI_2), óxido nítrico (NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e agentes vasoconstritores como: endotelinas, angiotensina II (ANG-II), prostaglandina H2 (PGH_2), tromboxano A2 (TXA_2) e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (VANHOUTTE e MOMBOULI, 1996).

O NO merece atenção especial devido ao seu papel no mecanismo de vasodilatação. Enzimas conhecidas como sintases do NO (NOS), as quais são divididas em dois grandes grupos isoformas constitutivas (cNOS: eNOS-endotelial e nNOS-neuronal) e isoforma induzível (iNOS), são capazes de catalisar a oxidação do nitrogênio terminal do grupamento guanidino da L-arginina formando NO e L-citrulina (SERAFIM et. al., 2012). Ambas, eNOS e nNOS, são estimuladas por uma cascata bioquímica que envolve a participação de íons cálcio (Ca^{2+}) e a calmodulina, e liberam o NO por curtos períodos de tempo (BODE-BÖGER et. al., 2007; NAPOLI et. al. 2006). A iNOS é ativada por determinados estímulos patológicos, tais como citocinas, incluindo a IL-1 e fator de necrose tumoral α (TNF- α). É ativada independentemente

do complexo Ca^{2+} -calmodulina, e libera grandes quantidades de NO por períodos de tempo relativamente longos (MONCADA et. al., 1991; IGNARRO e NAPOLI, 2004).

As células endoteliais são altamente sensíveis a estímulos químicos advindos de agonistas como a acetilcolina, bradicinina e histamina, e por estímulos físicos promovidos pela força de cisalhamento. A interação agonista-receptor na célula endotelial promove a formação de inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) induzindo a liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático, resultando em aumento nos níveis de Ca^{2+} de intracelular, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina e conseqüentemente ativando a NOS que irá estimular a conversão de L-arginina em NO pelo endotélio. A força física resultante do fluxo sanguíneo (força de cisalhamento) é um dos mais importantes estímulos para as células endoteliais produzirem NO e EDHF os quais levam à vasodilatação. O aumento na força de cisalhamento estimula mecanossensores presentes nas células endoteliais que podem ser as proteínas G, os canais iônicos, as junções intercelulares, as integrinas ou os lipídeos de membrana que captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da eNOS independente de Ca^{2+} . A capacidade das células endoteliais de perceber e responder às mudanças no fluxo sanguíneo é fator essencial na regulação do tônus vascular, e envolve a ativação de fatores de crescimento celular, promovendo o remodelamento da parede arterial e a manutenção da integridade do endotélio (FISHER et. al., 2001; SHYY e CHIEN, 2002).

Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula endotelial para a célula do músculo liso vascular, onde interage com o grupamento heme da guanilato ciclase solúvel (GCs) estimulando sua atividade catalítica, levando à formação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que por sua vez, diminui os níveis intracelular de Ca^{2+} (IGNARRO et. al., 1987; MURAD, 2008). Os mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz a vasodilatação incluem inibição da geração de IP_3 (na musculatura lisa), ativação de proteína quinase G, aumento do sequestro de Ca^{2+} citosólico, desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca^{2+} , estimulação da Ca^{2+} -ATPase de membrana e abertura de canais para potássio (K^+) (Figura 1) (DELBIN e ZANESCO, 2013).

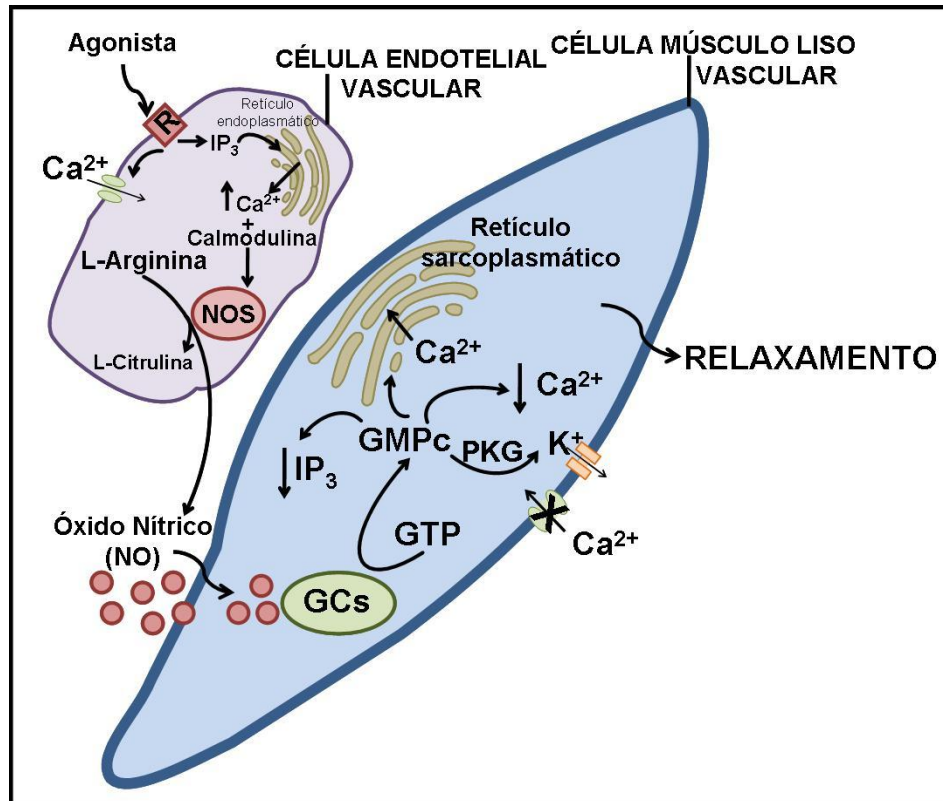


Figura 1: Mecanismo de ação do óxido nítrico e relaxamento do músculo liso vascular. Cálcio (Ca^{2+}), inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3), guanilato ciclase solúvel (GCs), guanosina monofosfato cíclico (GMPc), guanosina trifosfato (GTP), proteína quinase G, óxido nítrico sintase (NOS), receptor (R). (DELBIN e ZANESCO, 2013).

As células endoteliais possuem comportamento dinâmico e respondem às alterações de estímulos químicos e físicos, promovendo a síntese e liberação de substâncias vasoativas. Assim o papel das células endoteliais e mais especificamente a geração de NO, é extensamente estudado como componente importante do sistema cardiovascular (IGNARRO e NAPOLI, 2004). Na obesidade, o aumento na produção e liberação de adipocinas pró-inflamatórias (leptina, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6) e redução de adipocinas anti-inflamatórias (adiponectina), pode estar envolvido com a maior produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (BERG e SCHERER, 2005) e consequente redução da biodisponibilidade de NO (CONTI et. al., 2013), desempenhando papel importante no desenvolvimento de complicações vasculares associadas a disfunção endotelial em obesos (SALISBURY e BRONAS, 2015).

2.2-Célula muscular lisa vascular

Na célula muscular lisa vascular o processo de contração é resultado do deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina. Nas células musculares em geral, um evento muito importante para o estabelecimento da contração é o aumento da concentração do Ca^{2+} citoplasmático. O Ca^{2+} utilizado para ativação do aparelho contrátil entra no compartimento citoplasmático durante períodos de despolarização de membrana, estímulo mecânico ou estímulo químico por agonista. A fonte desse íon pode ser tanto o meio extracelular quanto compartimentos intracelulares, em especial o retículo sarcoplasmático (VASCONCELOS e CARVALHO, 2005). O Ca^{2+} presente no citosol liga-se à proteína calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina que irá ativar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK). A MLCK ativa pode, então, efetuar a transferência de um fosfato do ATP para a cadeia leve reguladora da miosina (rMLC), fazendo com que esta proteína ligue-se aos filamentos de actina promovendo a contração muscular. Os agonistas contráteis como a fenilefrina (PHE) e a serotonina (5-HT), ligam-se aos receptores acoplados a proteína G estimulando a fosfolipase C que catalisa a formação de segundos mensageiros como o IP_3 e o diacilglicerol (DAG). O IP_3 liga-se aos seus receptores localizados no retículo sarcoplasmático liberando Ca^{2+} para o citosol. A molécula de DAG ativa a proteína quinase C que por sua vez fosforila proteínas ligadas ao canal para cálcio do tipo L na membrana celular, favorecendo o influxo de Ca^{2+} para o citosol (Figura 2). Na presença de ATP, os ciclos de contração continuam até que a concentração de Ca^{2+} diminua e a quinase seja inativada. Assim, a miosina é desfosforilada pela fosfatase da cadeia leve da miosina do tipo I (MYPT1) (WEBB, 2003). Após um evento excitatório, o relaxamento e a homeostase do Ca^{2+} são obtidos por sua recaptação para os compartimentos de estoque intracelular e por sua extrusão para meio extracelular (VASCONCELOS e CARVALHO, 2005).

Outro mecanismo que contribui para a contração do músculo liso é a via de sinalização da RhoA/Rho-quinase. Quando há ligações entre agonistas vasoconstritores (ANG-II, 5-HT, ET-1) com receptor acoplados a proteínas G há estimulação da atividade dos fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs), responsável pela alteração da RhoA-GDP (forma inativa) para RhoA-GTP (forma ativa). Esta, por sua vez, ativa a Rho-quinase e a fosforilação da MYPT1, mantendo-a inativa e impossibilitando a desfosforilação da miosina, contribuindo assim para a

manutenção da contração do músculo liso (DIMOPOULOS et. al., 2007; NUNES et. al., 2010; WIRTH, 2010; SATOH et. al., 2011; DUONG-QUY et. al., 2013; MACKAY e KNOCK, 2014).

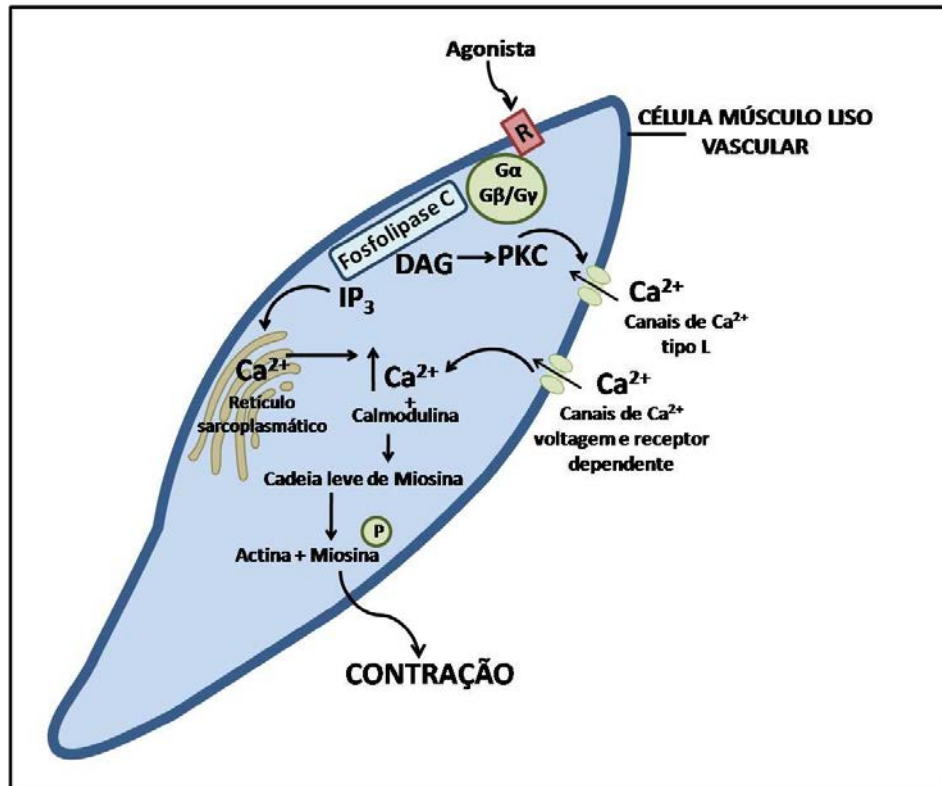


Figura 2: Mecanismo de contração do músculo liso vascular. Cálcio (Ca²⁺), inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG), proteína G (Gα/Gβ/Gγ), proteína quinase C (PKC), receptor (R). (DELBIN e ZANESCO, 2013).

2.3-Tecido adiposo perivascular

Evidências mostram que o PVAT pode modular a resposta inflamatória vascular, a reatividade vascular e a proliferação de células da musculatura lisa vascular (RAJSHEKER et al., 2010). O PVAT possui características especiais, está localizado ao redor dos vasos sanguíneos, encontra-se ao exterior da camada adventícia vascular e, interessante, não possui nenhuma estrutura laminar ou barreira que os separe (PVAT e camada adventícia vascular), podendo assim influenciar diretamente a função vascular (Figura 3) (GAO et. al., 2007).

O PVAT é responsável pela liberação de grande variedade de substâncias tais como: adipocinas (pro-inflamatórias: leptina, resistina e visfatina; anti-inflamatórias: adiponectina e adrenomedulina), citocinas e quimiocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, proteína quimiotática de monócitos-MCP1, inibidor do ativador de plasminogênio-PAI1) (RAJSHEKER et. al., 2010),

substâncias do sistema renina-angiotensina (angiotensina II e angiotensina 1-7) (GALVEZ-PRIETO, et. al., 2008) e moléculas gasosas (NO, peróxido de hidrogênio-H₂O₂, anion superóxido-O₂⁻ e sulfeto de hidrogênio-H₂S) (GAO et. al., 2007; FANG et. al., 2009).

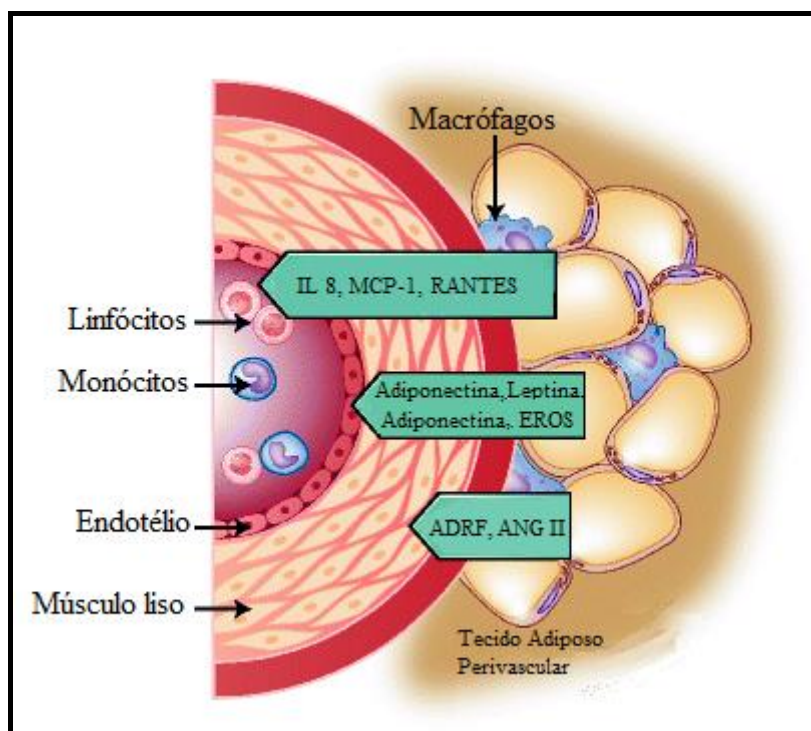


Figura 3: Tecido adiposo perivascular. Interleucina 8 (IL 8); Proteínas de quimioatração de monócitos (MCP-1); Quimiocina RANTE (regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais); Espécies reativas ao oxigênio (EROS); fator relaxante derivado dos adipócitos (ADRF); Angiotensina II (ANG II) (modificado de MEIJER et al., 2011).

Adicionalmente, o PVAT pode expressar importantes complexos tais como: receptores de adipocinas, proteína desacopladora 1 (UCP-1), coativador do receptor gama ativado por peroxissoma proliferador (PPAR- γ), receptor β_3 adrenérgico, receptor de citocinas, receptor de angiotensina II, enzima NADPH oxidase, sintase endotelial do NO (eNOS) (DASHWOOD et. al., 2007) e todas as isoformas da superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Ex-SOD), lipoxigenases e metaloproteases (SZASZ e WEBB, 2012). Em termos de classificação, o PVAT encontrado na aorta é considerado tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM), porém se assemelha muito mais com o TAM, por possuir células adiposas multiloculares, abundância em mitocôndrias e significativa expressão de UCP-1 (FITZGIBBONS et. al., 2011; ARAUJO et. al., 2015).

Arg, L-Arginina; NA, noradrenalina; NO, óxido nítrico; NOS, Sintase de óxido nítrico; O_2^- , Anion superóxido; ONOO, Peroxinitrito; PHE, Fenilefrina; PGH_2 , Prostaglandina H_2 ; PGI_2 , Prostaglandina I_2 (prostaciclina); PKG, Proteína quinase G; R, Receptor; sGC, Guanilato ciclase solúvel; SK_{ca} , Canais para K^+ de baixa condutância ativado por CA^{2+} ; SOD, Superóxido dismutase; SR, Retículo sarcoplasmático; TNF, Fator de necrose tumoral; CMLV, Célula de músculo liso. (modificado de Aghamohammadzadeh et. al. 2012).

Quanto às adipocinas liberadas pelo PVAT, como a leptina e adiponectina, foram identificadas diferentes funções parácrina nos vasos sanguíneos. Em condições fisiológicas foi demonstrado que a adiponectina pode controlar o tônus vascular local, podendo induzir diretamente ao relaxamento vascular em aorta de camundongos, bem como, reduzir a resposta contrátil em aorta de ratos (FESUS et. al., 2007). A leptina por sua vez, possui efeito direto no relaxamento vascular em artéria mesentérica de cães (MOHAMMED et. al., 2007), aorta de coelhos (SAHIN e BARISKANER, 2007) e em humanos (NAKAGAWA et. al., 2002).

Em modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica a massa total do PVAT está aumentada, com prejuízos na produção ou secreção de adipocinas, com redução de adiponectina (KADOWAKI e YAMAUCHI, 2005) e aumento na concentração de leptina, o que pode acelerar o processo de aterosclerose, aumentando o recrutamento de monócitos, estresse oxidativo (BOULOUMIE et. al, 1999; SZASZ et. al., 2012) e liberação de outras citocinas aterogênicas como $TNF-\alpha$, IL-6 e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), os quais induzem a inflamação e angiogênese, respectivamente (BERG e SCHERER, 2005; KNUDSON et. al, 2005; KORDA et. al, 2008). Assim, o PVAT na obesidade pode estar associado a complicações cardiovasculares por prejuízo do controle vascular (YUDKIN et. al., 2005).

2.4-Exercício físico aeróbio

Na função endotelial, o exercício físico aeróbio é considerado um potente estimulador da produção de NO através da ativação de mecanossensores presentes nas células endoteliais os quais são acoplados a complexos bioquímicos que ativam Ras/MEK/ERK, s-Src e PI3K/Akt que por sua vez regulam a expressão gênica da eNOS e aumentam a produção de NO (TRAUB e BERK, 1998; FISHER et. al., 2001; KOJDA e HAMBECHT, 2005). Assim, um dos efeitos benéficos do exercício físico regular na melhora da função vascular está diretamente relacionado à sua capacidade em estimular a síntese de NO pelas células endoteliais.

Outra modificação vascular provocada pelo exercício físico está relacionada à expressão e à atividade de enzimas antioxidantes. O treinamento físico aeróbio moderado é capaz de promover uma adaptação entre a geração de EROs e a eficácia dos mecanismos antioxidantes, com adaptações teciduais específicas envolvendo um mecanismo regulatório complexo. Diversos estudos demonstraram aumento na expressão vascular da enzima SOD-1, SOD-2, SOD-3 e/ou em sua atividade antioxidante (YAMASHITA et. al., 1999; FUKAI et. al., 2000; RUSH et. al., 2005; DE MORAES et. al., 2008). Alguns estudos também demonstraram respostas adaptativas na expressão e/ou atividade da CAT e GSH-Px (SOMANI et. al., 1996; FREDERICO et. al., 2009; XU et. al., 2010). Essas adaptações cardiovasculares na resposta antioxidante promovidas pelo exercício físico podem melhorar a função endotelial através da diminuição do acúmulo de EROs e consequente aumento na biodisponibilidade de NO.

Na obesidade pode ocorrer hipertrofia e hiperplasia das células do tecido adiposo, com aumento da liberação de adipocinas pro-inflamatórias e redução na liberação de adipocinas anti-inflamatórias podendo levar o tecido adiposo ao estado de inflamação (SAKURAI et. al., 2013). O exercício físico tem se mostrado uma ferramenta importante na prevenção do estado inflamatório, reduzindo a expressão de proteínas pró-inflamatórias e aumentando a expressão de proteínas anti-inflamatórias em diferentes regiões do tecido adiposo. Estudos demonstraram que o exercício físico, em modelos experimentais de obesidade, é capaz de atenuar as alterações na expressão das adipocinas inflamatórias leptina, TNF- α , proteínas de quimioatração de monócitos (MCP-1) e interleucina 6 (IL-6) (ZACHWIEJA et. al., 1997; GOLLASCH et. al., 2004; VIEIRA et. al., 2009; SAKURAI et. al., 2005; SAKURAI et. al., 2009; BRADLEY et. al., 2008). Em humanos foi relatado redução plasmática de MCP-1, interleucina 6 (IL-6), TNF- α e leptina após treinamento físico aeróbio (BRUUN et. al., 2006; KOHUT et. al., 2006; CHRISTIANSEN et. al., 2010; KONDO et. al., 2006). Além disso, o exercício físico tem sido eficiente em aumentar a expressão da proteína anti-inflamatória adiponectina tanto em humanos, na presença de sobrepeso/obesidade, quanto em modelo experimental (CHRISTIANSEN et. al., 2010; BRUUN et. al., 2006; MIYAZAKI et. al., 2010).

Até o momento apenas dois estudos avaliaram o papel do tecido adiposo perivascular na reatividade vascular em animais treinados e alimentados com dieta hiperlipídica. Foi observado redução na resposta contrátil máxima induzida pela endotelina 1 na artéria coronária circunflexa esquerda de suínos com hipercolesterolemia familiar, porém, não investigaram os possíveis

mecanismos envolvidos (REIFENBERGER et. al., 2007; BUNKER e LAUGHLIN, 2009). Novos estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de investigar o papel do PVAT nas respostas vasculares na obesidade, bem como os possíveis benefícios do exercício físico aeróbio nesta via de sinalização, podendo contribuir com avanços importantes na terapêutica das doenças cardiometabólicas.

3.0-OBJETIVO GERAL

O presente estudo avaliou o efeito do tecido adiposo perivascular na reatividade vascular de aorta de ratos treinados e alimentados com dieta hiperlipídica.

Objetivos específicos:

-Avaliação da resposta relaxante e contrátil em anéis de aorta na ausência (PVAT-) e na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular:

√ Resposta relaxante: acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP);

√ Resposta contrátil: fenilefrina (PHE) e serotonina (5-HT);

-Quantificação sérica:

√ Glicose, colesterol e triglicerídeos.

-Quantificação plasmática:

√ Insulina e leptina.

-Expressão de proteínas:

√ Aorta: sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS)

√ PVAT: sintase induzível do óxido nítrico (iNOS)

4.0-MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal do Instituto de Biociências na Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro - CEUA-IB-UNESP (n.º26-002846-2/2, Anexo 1).

4.2-Animais

Ratos *Wistar* (290 - 320 g) foram fornecidos pela Universidade Estadual de Campinas (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório-CEMIB) e mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM-UNICAMP). Os animais foram mantidos em caixas coletivas com dois a três animais em cada.

4.3-Desenho experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Figura 4):

1. Controle sedentário (c-SD): ratos alimentados com ração controle e sedentários;
2. Controle treinado (c-TR): ratos alimentados com ração controle e submetidos ao treinamento físico aeróbio;
3. Dieta Hiperlipídica e sedentário (dh-SD): ratos alimentados com dieta hiperlipídica e sedentários;
4. Dieta Hiperlipídica e treinado (dh-TR): ratos alimentados com dieta hiperlipídica e submetidos ao treinamento físico aeróbio;

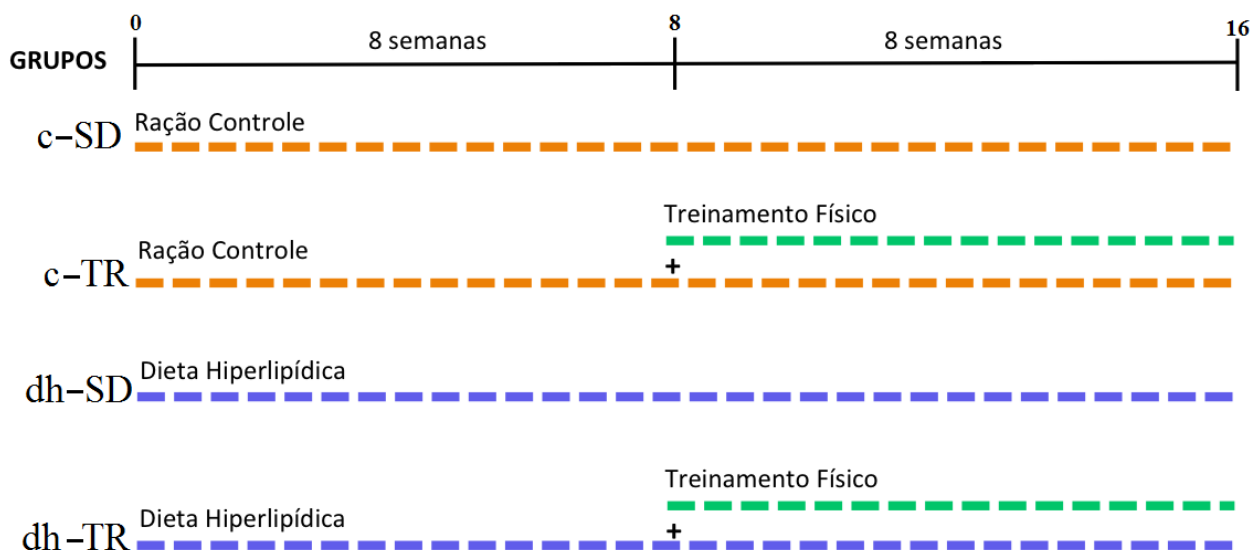


Figura 5: Grupos Experimentais

Todos os animais tiveram livre acesso à água e a ração controle balanceada (Nuvilab CR1) ou dieta hiperlipídica (53% de carboidratos, 20% de proteínas e 21% de lipídios e 6% fibras/minerais e vitaminas) e foram mantidos em ciclos de claro/escuro (12/12 h). A composição da dieta hiperlipídica foi descrita anteriormente (DE MORAES et. al., 2008).

Ao início do protocolo os animais dos grupos dh-SD e dh-TR foram alimentados com dieta hiperlipídica por 8 semanas, após este período o grupo dh-TR iniciou o protocolo de treinamento. Em ambos os grupos a dieta hiperlipídica teve continuidade por mais 8 semanas, totalizando assim 16 semanas de dieta hiperlipídica. O mesmo protocolo experimental foi aplicado para os grupos controle, c-SD e c-TR, no entanto foi fornecida ração controle.

A eficácia da dieta hiperlipídica em induzir adiposidade foi avaliada ao final do protocolo experimental através do peso corporal e do tecido adiposo branco da região epididimal.

4.4-Peso corporal e consumo alimentar

O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram mensurados ao início do protocolo experimental e semanalmente até o final do protocolo.

4.5-Programa de treinamento físico

4.5.1-Adaptação e determinação da intensidade de treinamento

O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira ergométrica, com baias individuais (Gesam, SP, BRA). Uma semana antes do início do protocolo experimental os animais foram submetidos a três sessões de adaptação, contendo cada sessão 15 minutos de duração, iniciando com uma velocidade de 5 metros/minutos (m/min) até 10 m/min. Após o período de adaptação, foi realizado o teste de esforço máximo para determinar a intensidade de treinamento. O teste consistiu de aumento progressivo da velocidade em 5 m/min (iniciando em 5 m/min) a cada 3 minutos, com 0% de inclinação até a exaustão. O critério utilizado para a determinação da exaustão e interrupção do teste foi o momento em que o animal apresentou incapacidade de manter a corrida mediante incremento da velocidade (BROOKS et. al., 1978). Este teste apresenta correlação significativa com a medida do consumo direto de oxigênio em ratos machos, o que permite fidedignidade para o controle do treinamento físico (RODRIGUES et. al., 2006; 2007).

4.5.2-Programa de Treinamento Físico

O programa de treinamento físico foi iniciado com velocidade de 10 m/min aumentando progressivamente até atingir a velocidade final correspondente 50-60% da velocidade máxima estabelecida anteriormente para cada animal. Progressões de tempo na duração das sessões também foram realizadas até que os animais conseguissem permanecer correndo por 60 minutos, cada sessão de treinamento envolveu: 10 min a 40% da velocidade máxima, 40 min a 50-60% da velocidade máxima e 10 min a 40% da velocidade máxima. Os animais foram agrupados para o treinamento físico de acordo com a velocidade de treinamento.

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

Ao término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por um período de 48 horas (para verificação dos efeitos crônicos do treinamento físico aeróbio) e jejum de 12 horas.

4.6-Medida de glicemia

A glicose sanguínea de jejum foi mensurada utilizando uma gota de sangue caudal e os valores foram constatados por fitas reativas de teste (Advantage Roche, SP, BRA) e monitor digital de glicemia (Advantage Roche) seguindo as instruções do fabricante. A antecipação desta coleta visou excluir a interferência do uso de anestésico na medida de glicose de jejum.

4.7-Obtenção das amostras de plasma, soro, aorta e tecido adiposo perivascular

Os animais foram anestesiados com 60 mg/Kg de tiopental sódico intraperitoneal e uma incisão longitudinal foi feita no abdômen do animal para coleta de amostra de sangue arterial (7 ml), obtida do ramo descendente da aorta abdominal. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rotações/minuto para obtenção do plasma ou soro, e congelados em freezer a -80 °C para posteriores análises. Em seguida, os animais foram eutanasiados, o coração e a aorta torácica foram removidos cuidadosamente e banhados em solução preparada de Krebs contendo (mM): NaCl- 118; NaHCO₃- 25; glicose- 5,6; KCl- 4,7; KH₂PO₄- 1,2; MgSO₄.7H₂O- 1,17 e CaCl₂.2H₂O- 2,5.

4.8-Curva concentração-resposta em anéis de aorta

A aorta torácica foi isolada e cortada em anéis de 3 milímetros (mm), para medir o comprimento de cada anel foi utilizado um microscópio e retículo micrométrico (Nikon Instruments, NY, EUA). Os anéis foram preparados com ausência ou presença de tecido adiposo perivascular (PVAT-/PVAT+) e foram então montados em sistema de banho de órgãos isolados com 8 cubas (PanLab Harvard Apparatus, Espanha) e mantidos em 10 ml da solução de Krebs aquecida a 37 °C, pH 7,4 e areada com 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. A tensão basal inicial para aorta foi de 10 miliNewtons (mN), periodicamente ajustada até sua estabilização. As alterações de tensão do tecido foram registradas em sistema PowerLab 400TM de aquisição de dados (Software versão 7,0, AD Instruments).

Após o período de 1 hora de estabilização, os anéis foram contraídos com solução de cloreto de potássio (KCl) 80 mM para verificação da viabilidade dos anéis e posteriormente lavados com solução de Krebs. Curvas cumulativas concentração-resposta com endotélio intacto na preparação PVAT- e PVAT+ foram obtidas ao agonista vasodilatador acetilcolina (ACh; 1 nM-30 µM) e nitroprussiato de sódio (SNP; 1 nM-100 µM). O relaxamento foi plotado como

porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (em concentração necessária para produzir 50-80% da resposta máxima induzida pelo KCl 80 mM). Os efeitos contráteis do agonista α -adrenérgico, fenilefrina (PHE; 1 nM-100 μ M, na presença de propranolol 100 nM), e à serotonina (5-HT; 10nM-300 μ M) também foram avaliados. Os valores de contração foram plotados em mN por mm de artéria (mN/mm).

As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações do agonista em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas (VAN ROSSUM, 1963). A análise de regressão não linear para determinar os parâmetros: resposta máxima que o agonista produz (E_{MAX}), concentração do agonista necessária para produzir metade da resposta máxima ($\log EC_{50}$ - pEC_{50}) e coeficiente angular ou inclinação da curva concentração-resposta (n) foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, EUA).

4.9-Determinação de fatores bioquímicos séricos e plasmáticos

As amostras de soro fresco foram utilizadas para determinação dos níveis de colesterol total (CT, mg/dL) e triglicérides (TG, mg/dL) medidos pelo método enzimático utilizando-se kit específico e seguindo as instruções do fabricante (Katal, MG-Brasil).

Também foram utilizadas amostras de plasma para determinação das concentrações de leptina (ng/mL) através de kit comercial, pelo método de ELISA (Millipore, MA-EUA) e de insulina (ng/mL) através do método de RIA utilizando insulina radioativa marcado com ^{125}I (MATTHEWS et. al, 1985).

4.10- Determinação da expressão de proteínas

Amostras de aorta torácica, assim como o seu respectivo PVAT foram congeladas a -80 °C, e posteriormente homogeneizadas (pulverizador) em tampão Ripa (Upstate, Temecula, CA, EUA). O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante recolhido para a determinação da concentração de proteína (Pierce BCA Protein Assay kit, IL, EUA), e então a quantidade necessária para aplicar 50 μ g de proteína para aorta e 100 μ g de proteína para o PVAT no gel de acrilamida foi calculada para cada amostra. As amostras foram aplicadas no gel com SDS (Lauril Sulfato Sódico)-poliacrilamida (SDS-PAGE) e submetidas a eletroforese em gel em um sistema Mini-Protean II (Eletrophoresis Cell, BioRad, CA, EUA).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF Hybond, Amersham Biosciences, NJ, EUA). Para a detecção das proteínas de

interesse, as membranas foram incubadas com anticorpo primário para eNOS (1:750, BD Biosciense, CA, EUA) na aorta e iNOS (1:1000, BD Biosciense, CA, EUA) no PVAT. Em seguida, as membranas foram lavadas e posteriormente incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) correspondente ao primário em questão. Ao final as proteínas de interesse foram detectadas por uma reação de quimioluminescência utilizando um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham Biosciences) e reveladas em fotodocumentador ImagemQuant LAS4000 (GE Healthcare, NY-EUA). Todo o protocolo de incubação foi repetido com anticorpo primário para detecção α -actina (1:5000, Abcam, MA, EUA) para aorta e α -tubulina (1:1000, Santa Cruz, CA, EUA) no PVAT e respectivo anticorpo secundário. A expressão da α -actina e α -tubulina foi medida para normalização da expressão das proteínas quantificadas. As bandas foram quantificadas mediante análise densitométrica, por um scanner e para análise e quantificação das bandas foi utilizado o programa de análise de imagens Image J (NIH, EUA). Todos os resultados são apresentados como relativos ao grupo c-SD (a densitometria do grupo c-SD para cada proteína foi estabelecida como sendo igual a 1 e a partir deste valor a densitometria dos demais grupos foi calculada).

4.11-Analise estatística

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

5.0-RESULTADOS

5.1-Determinação da velocidade do treinamento físico aeróbio

Ao início do protocolo de treinamento físico não houve diferença entre os grupos para todas as variáveis analisadas no teste de esforço máximo: tempo de exaustão, velocidade de exaustão e distância de exaustão (Figura 6, painéis A, B e C respectivamente). Após o teste de exaustão inicial foi definida a velocidade de treinamento dos grupos c-TR e dh-TR, apresentando os seguintes valores: de 12 a 14 m/min, velocidades correspondentes a 50-60% da velocidade máxima.

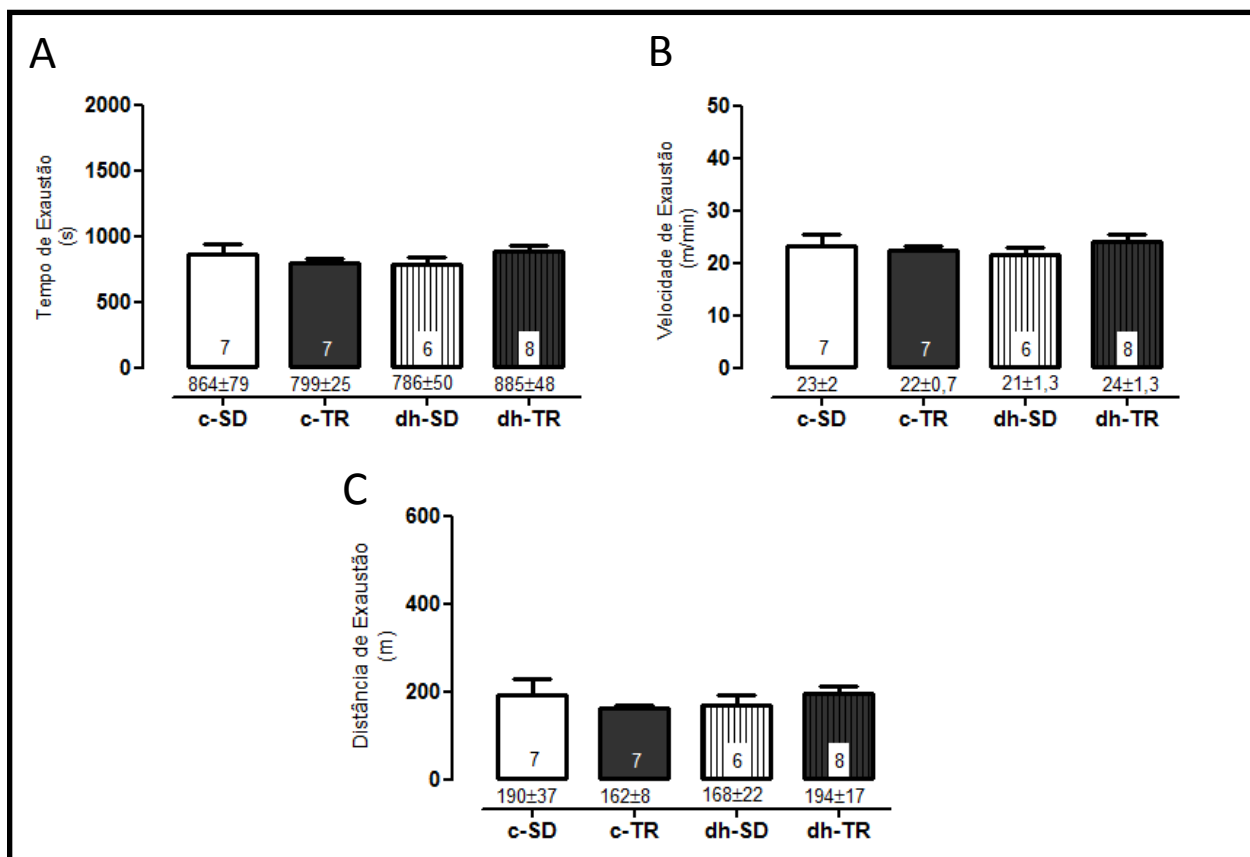


Figura 6: Teste de esforço máximo inicial. Tempo de exaustão (A), Velocidade de exaustão (B) e Distância de exaustão (C). Animais dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido dentro das barras do gráfico. Valores expressos em média ± SEM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.2-Eficácia do treinamento físico aeróbio

Foi observado aumento do tempo total, distância total percorrida e velocidade máxima nos grupos treinados, c-TR e dh-TR, quando comparados aos demais grupos sedentários c-SD e

dh-SD, demonstrando a eficácia do programa de treinamento físico aeróbio (Figura 7, painéis A, B e C respectivamente).

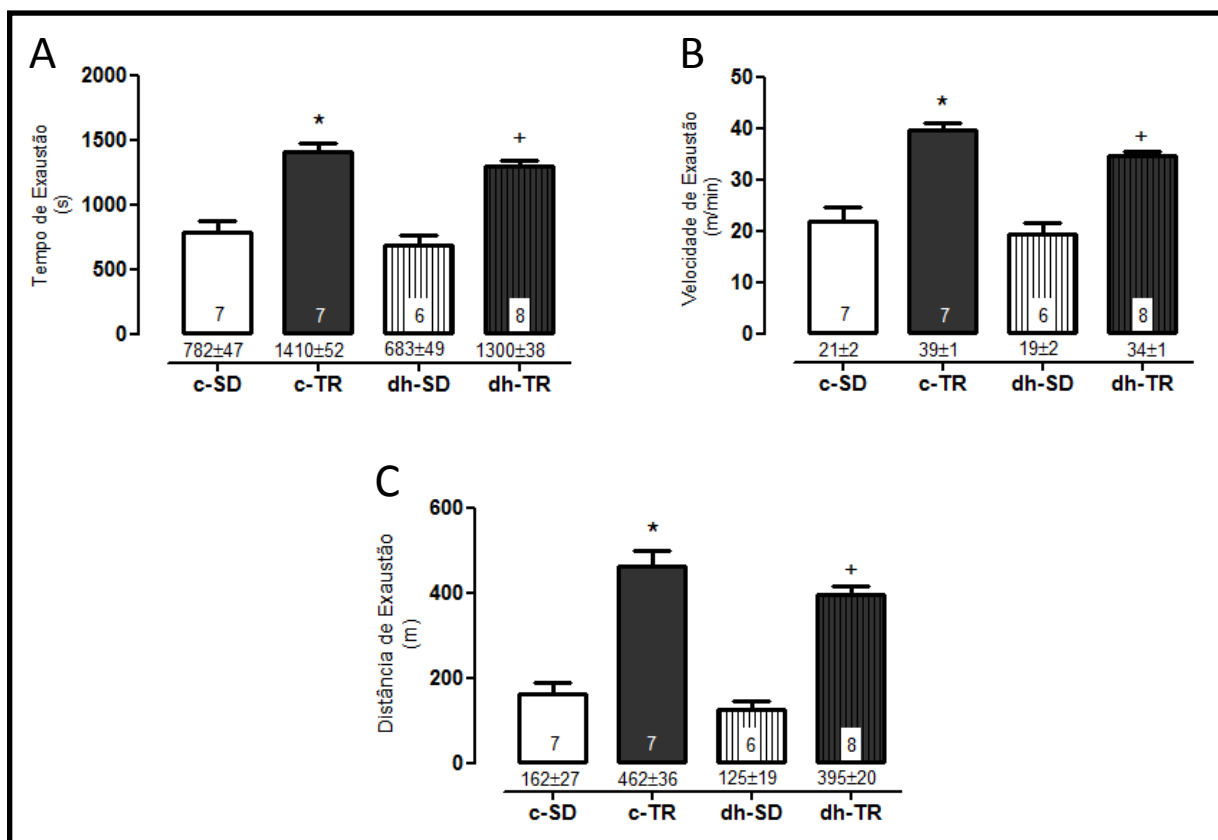


Figura 7: Teste de esforço máximo final. Tempo de exaustão (A), Velocidade de exaustão (B) e Distância de exaustão (C). Animais dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido no gráfico. Valores expressos em média ± SEM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; + $p < 0,05$ comparado ao dh-SD.

5.3-Peso corporal, gordura epididimal e fatores bioquímicos

O peso corporal inicial foi similar em todos os grupos (Figura 8, painel A). Após o protocolo de treinamento físico o grupo c-TR apresentou redução no ganho de peso de aproximadamente 36% quando comparado com o grupo c-SD. A dieta hiperlipídica promoveu aumento no ganho de peso corporal no grupo dh-SD, aproximadamente 48% quando comparado ao grupo c-SD. O treinamento físico foi eficaz em reduzir este valor no grupo dh-TR em aproximadamente 28% comparado ao dh-SD (Figura 8, painel C).

Similarmente, a gordura epididimal no grupo c-TR apresentou-se reduzida em aproximadamente 42% comparado ao grupo c-SD. O grupo dh-SD apresentou um aumento de

gordura epididimal em aproximadamente 200% comparado ao grupo c-SD. O treinamento físico reduziu este valor em aproximadamente 24% comparado ao dh-SD (Figura 8, painel D).

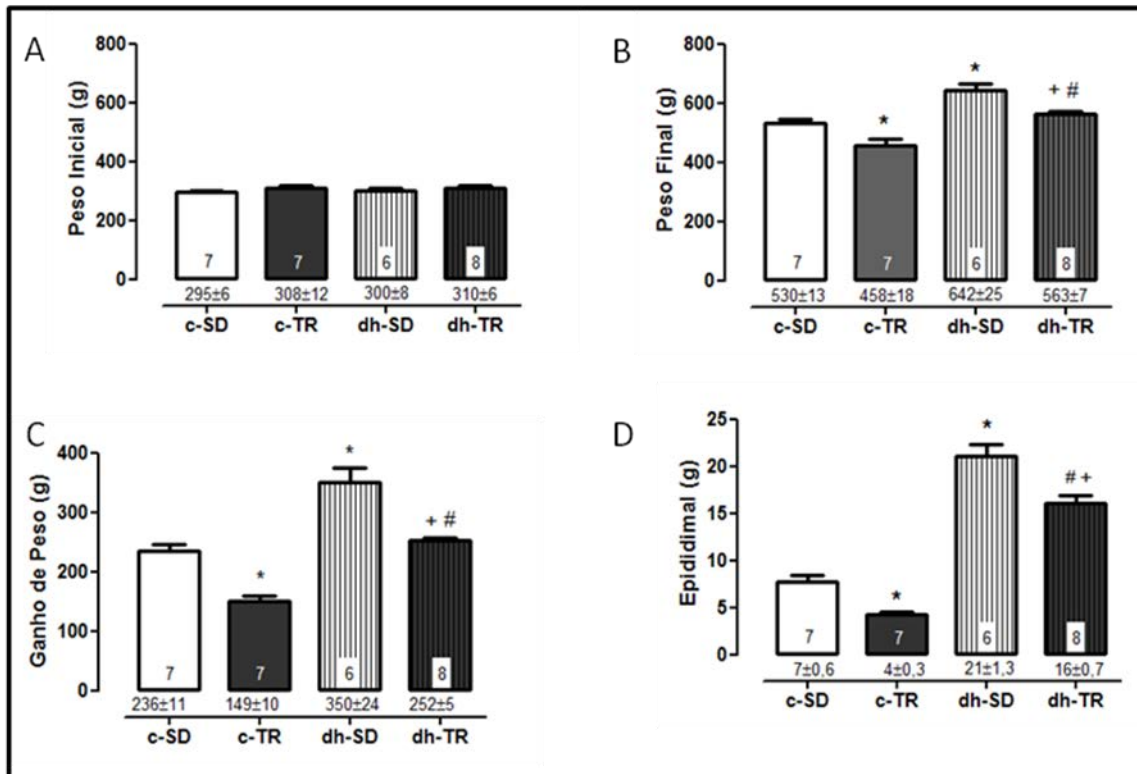


Figura 8: Peso corporal inicial (painel A), Peso corporal final (painel B), Ganho de peso (painel C) e Gordura epididimal (painel D). Animais dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido no gráfico. Valores expressos em média ± SEM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; # $p < 0,05$ comparado ao c-TR; + $p < 0,05$ comparado ao dh-SD;

Interessantemente os valores de glicemia foram reduzidos no grupo c-TR quando comparado ao grupo c-SD. A dieta hiperlipídica não alterou esses valores no grupo dh-SD quando comparado com o grupo c-SD. Porém, quando comparamos o grupo dh-TR ao grupo dh-SD, esses valores foram reduzidos (Tabela 1).

Não houve diferença significativa entre os grupos para os valores de CT. A dieta hiperlipídica promoveu aumento dos valores de TG no grupo dh-SD quando comparado ao grupo c-SD. O treinamento realizado no grupo dh-TR foi efetivo na redução dos valores de TG quando comparado ao grupo dh-SD (Tabela 1).

Não houve diferença nos valores de insulina plasmática entre os grupos c-SD, c-TR e dh-TR. A dieta hiperlipídica promoveu aumento dos valores de insulina no grupo dh-SD quando comparado ao grupo c-SD. O treinamento realizado pelo grupo dh-TR foi capaz de reduzir os valores de insulina, quando comparados ao grupo dh-SD (Tabela 1).

O grupo c-TR apresentou redução na concentração de leptina circulante quando comparado ao grupo c-SD. Enquanto que a dieta hiperlipídica aumentou os valores de leptina no grupo dh-SD comparado ao grupo c-SD, o treinamento realizado pelo grupo dh-TR reduziu estes valores quando comparado ao grupo dh-SD (Tabela 1).

Tabela 1: Concentrações de glicose, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), insulina e leptina de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

	Grupos			
	c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
Glicose (mg/dl)	97±4 (7)	79±2* (7)	102±3 (6)	86±1 ⁺ (8)
CT (mg/dl)	51±4 (7)	46±4 (7)	42±5 (6)	35±3 (8)
TG (mg/dl)	59±5 (7)	32±5 (7)	147±12* (6)	69±8 ^{#+} (8)
Insulina (ng/ml)	3,5±1(7)	3,0±0,6 (7)	7,3±0,7* (6)	3,7±1,0 ⁺ (8)
Leptina (ng/ml)	9,2±2 (13)	2,4±0,9* (8)	36,0±7,5* (9)	16,4±2,5 ^{*#+} (14)

CT: Colesterol Total; TG: Triglicérides. O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na tabela. Valores expressos em média ± SEM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: *p<0,05 comparado ao c-SD; # p<0,05 comparado ao c-TR; ⁺p<0,05 comparado ao dh-SD.

5.4-Reatividades vascular

5.4.1-Characterização dos anéis

Interessantemente, o peso do PVAT foi reduzido no grupo c-TR ($1,88 \pm 0,23$ mg/mm) quando comparado ao grupo c-SD ($2,98 \pm 0,08$ mg/mm). A dieta hiperlipídica aumentou o peso do PVAT no grupo dh-SD ($4,56 \pm 0,33$ mg/mm) e o treinamento reduziu estes valores no grupo dh-TR ($2,40 \pm 0,32$ mg/mm) quando comparados ao grupo dh-SD (Figura 9).

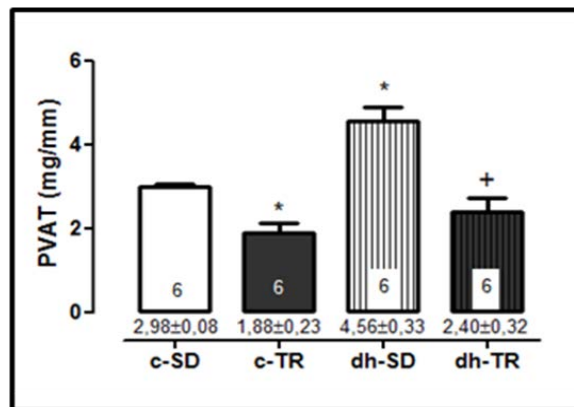


Figura 9. Peso do PVAT de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. Valores expressos em média \pm SEM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; $^+ p < 0,05$ comparado ao dh-SD.

Não foram observadas diferenças no delta de contração máxima induzida pelo KCl 80 mM (Δ KCl) nos anéis na ausência ou presença do PVAT, bem como entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de delta da contração máxima induzida pelo cloreto de potássio 80 mM (Δ KCl, mN/mm) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

	GRUPOS			
	c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
PVAT-	10 \pm 1	9 \pm 1	9 \pm 1	9 \pm 1
Δ KCl (mN/mm)				
PVAT+	9 \pm 1	9 \pm 1	8 \pm 1	8 \pm 1

Valores expressos como média \pm SEM. Teste *t Student*. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.4.2-Curvas de Relaxamento

Não foram observadas diferenças no delta da pré-contracção induzida pela fenilefrina (PHE) nos anéis onde foram realizadas as curvas de relaxamento, na ausência ou presença do PVAT, bem como entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de delta da pré-contracção induzida pela fenilefrina (PHE) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

	GRUPOS							
	c-SD		c-TR		dh-SD		dh-TR	
Δ PHE	(mN/mm)	(% KCl)	(mN/mm)	(% KCl)	(mN/mm)	(% KCl)	(mN/mm)	(% KCl)
PVAT-	6±1	60±1	5±1	55±2	5±1	55±2	5±1	55±3
PVAT+	5±1	55±2	5±1	55±2	4±1	50±3	4±1	50±4

Valores expressos como média \pm SEM. Teste *t Student*. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni.

Os agonistas acetilcolina (ACh: 1 nM-30 μ M) e nitroprussiato de sódio (SNP: 100 pM-100 μ M) produziram relaxamento concentração-dependente em anéis de aorta com endotélio intacto na ausência (PVAT-) ou presença (PVAT+) de tecido adiposo perivascular. A presença do PVAT não alterou os valores de pEC₅₀ e E_{MAX} para todos os grupos experimentais, tanto para ACh (Figura 10, Tabela 4), quanto para SNP (Figura 11, Tabela 4).

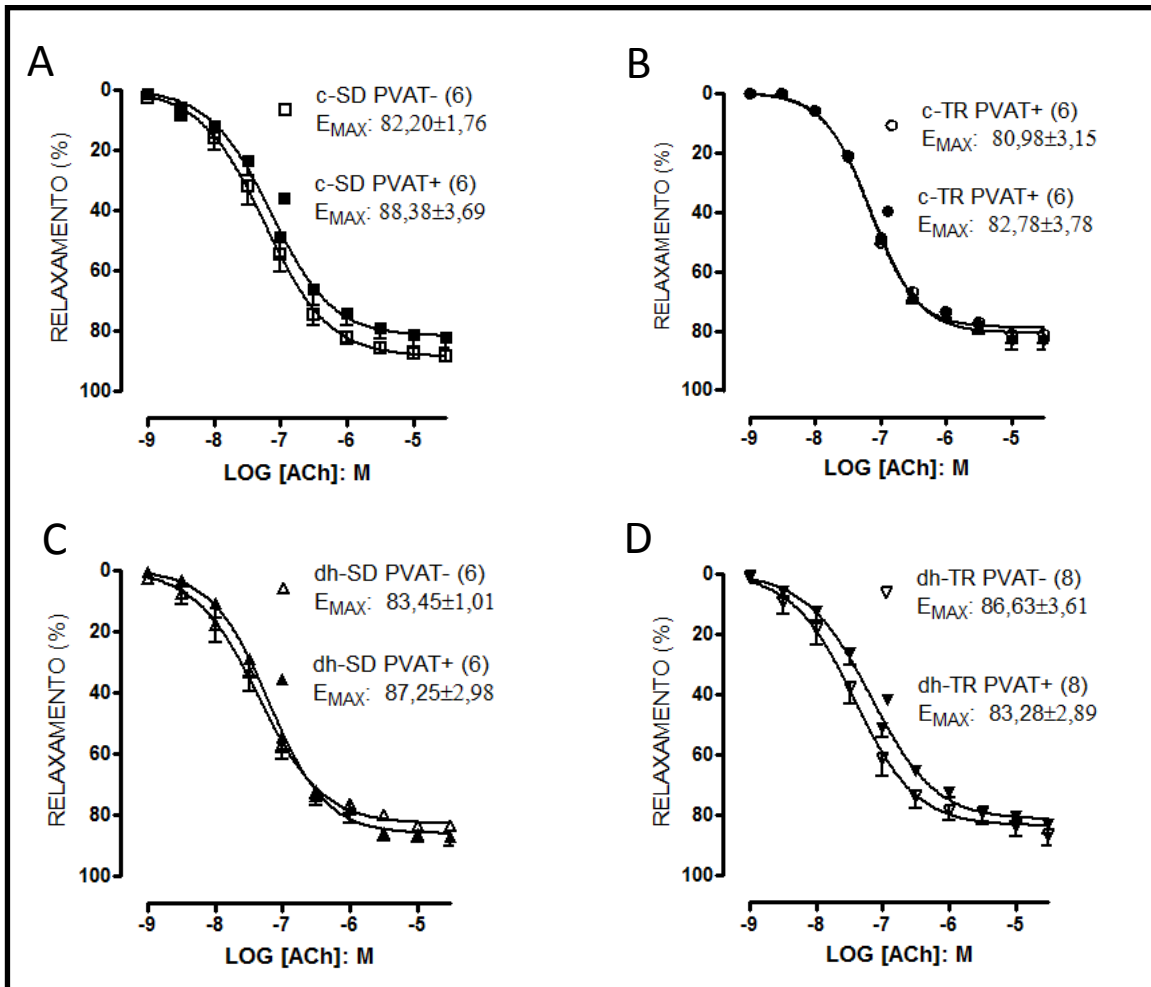


Figura 10: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos em média \pm SEM. Teste t Student.

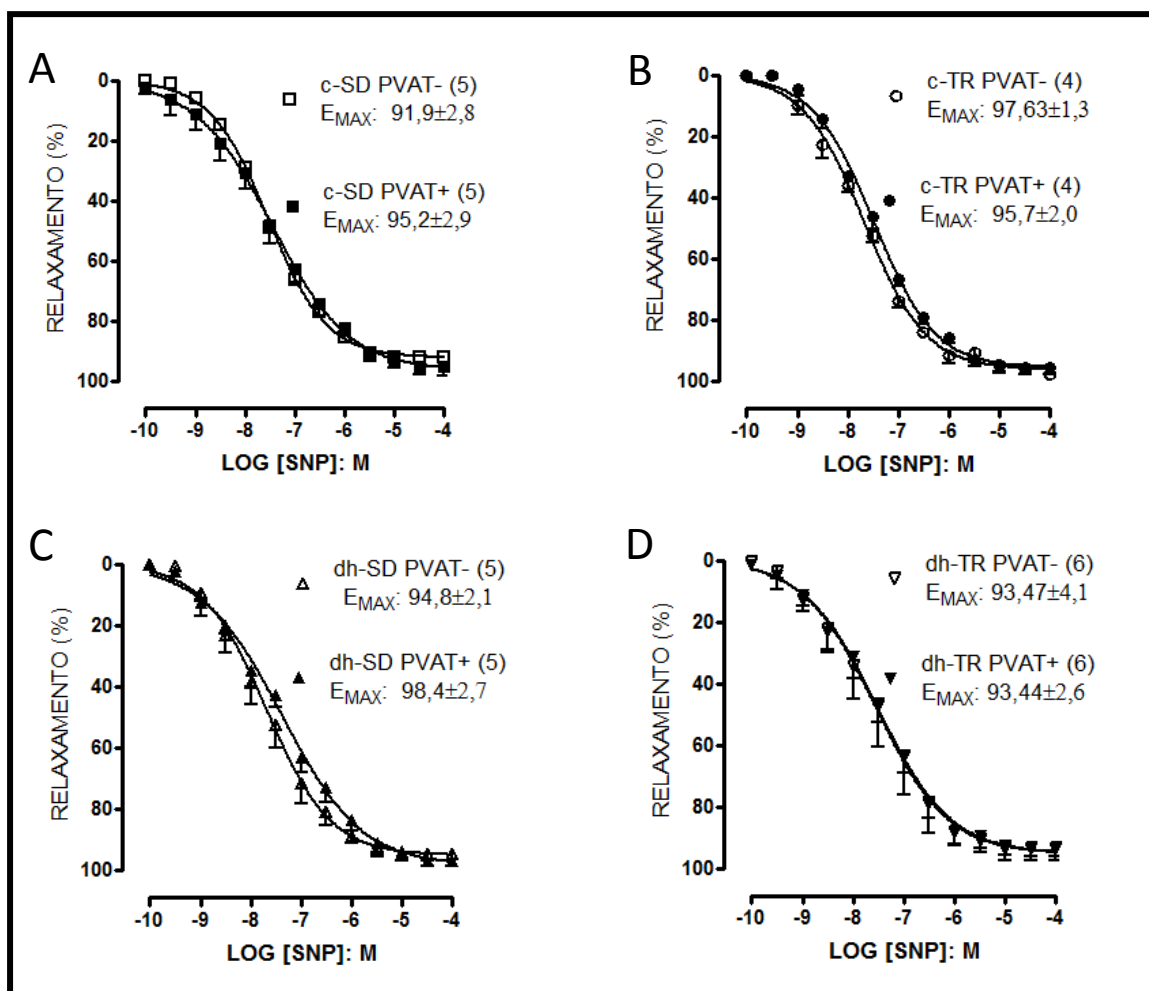


Figura 11: Curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos em média \pm SEM. Teste t Student.

Tabela 4: Valores de potência (pEC₅₀) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (SNP) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

	GRUPOS - pEC ₅₀				
	c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR	
ACh	PVAT-	7,24±0,13	7,16±0,03	7,36±0,14	7,40±0,10
	PVAT+	7,14±0,10	7,13±0,04	7,20±0,12	7,18±0,08
SNP	PVAT-	7,54±0,12	7,49±0,1	7,68±0,19	7,58±0,29
	PVAT+	7,45±0,12	7,68±0,08	7,37±0,16	7,52±0,17

Valores de potência são representados como -log da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima. Valores expressos como média ± SEM. Teste t Student. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.4.3- Curvas de Contração

Os agonistas fenilefrina (PHE: 1 nM-100 µM) e serotonina (5-HT: 10 nM-300 µM) produziram contração dependente da concentração em anéis de aorta com endotélio intacto na ausência (PVAT-) ou presença (PVAT+) de tecido adiposo perivascular.

A presença do PVAT nos anéis de aorta promoveu redução E_{MAX} (mN/mm) à PHE em todos os grupos: c-SD (PVAT+: 3,5±0,4 e PVAT-: 6,6±0,5), c-TR (PVAT+: 4,7±0,8 e PVAT-: 7,9±1,4), dh-SD (PVAT+: 2,1±0,2 e PVAT-: 6,1±0,6) e dh-TR (PVAT+: 2,5±0,4 e PVAT-: 5,8±0,5). Nenhuma diferença foi observada nos grupos em relação ao delta de redução à E_{MAX} promovida pela presença do PVAT. Nenhuma alteração nos valores de pEC₅₀ foi observada para todos os grupos (Figura 12, Tabela 5).

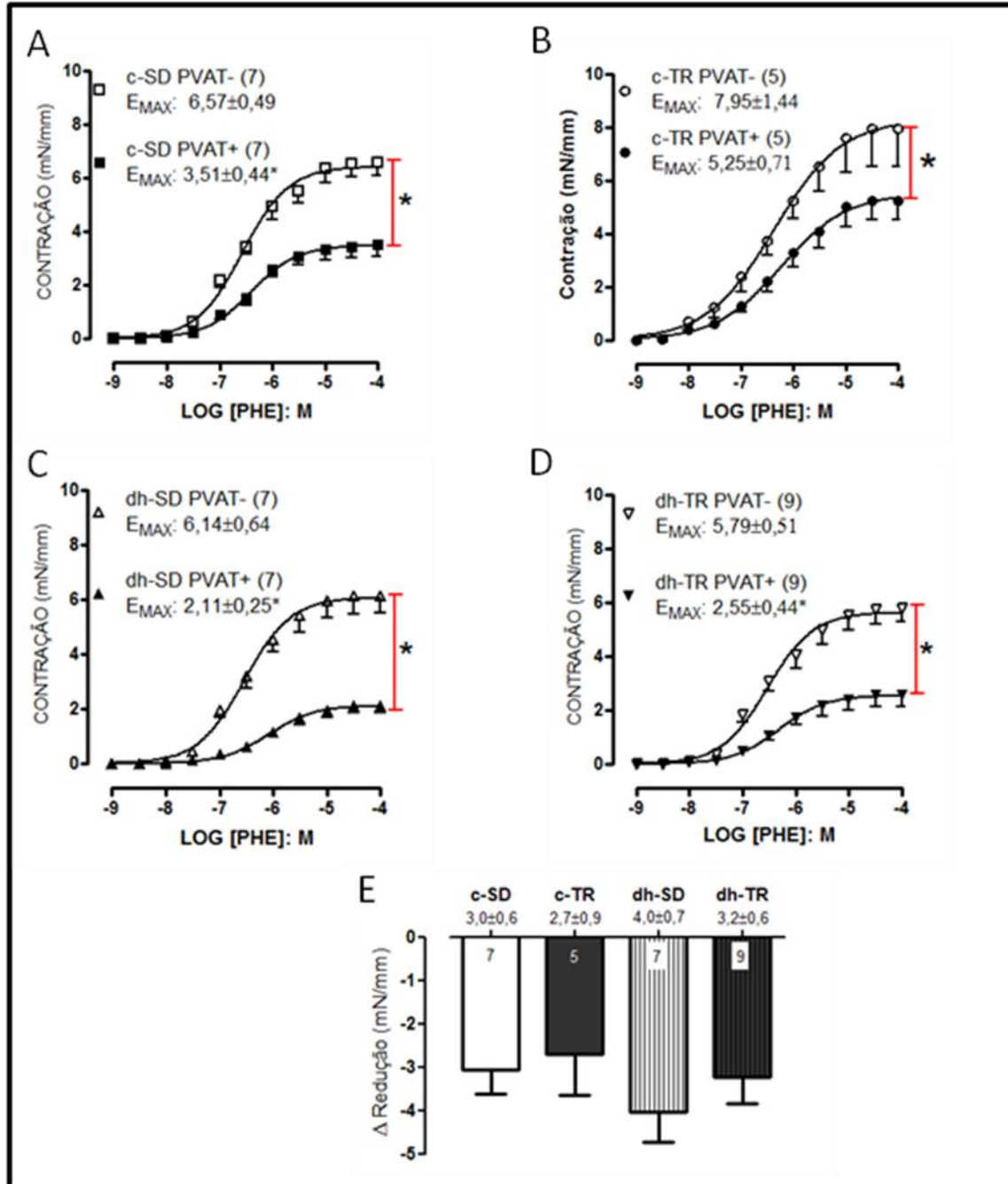


Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). Delta de redução da E_{MAX} na presença do PVAT (painel E). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos em média \pm SEM. Test t Student: * $p < 0,05$ comparado ao respectivo anel PVAT- (painéis A, B, C, D). ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; + $p < 0,05$ comparado ao dh-SD (painel E).

Similarmente, a presença do PVAT promoveu redução da E_{MAX} (mN/mm) à 5-HT em anéis de aorta em todos os grupos experimentais: c-SD (PVAT+: $7,0 \pm 0,9$ e PVAT-: $9,7 \pm 1,3$), c-TR (PVAT+: $7,8 \pm 0,4$ e PVAT-: $10,3 \pm 0,6$), dh-SD (PVAT+: $4,1 \pm 0,1$ e PVAT-: $10,5 \pm 1,2$) e dh-TR (PVAT+: $5,9 \pm 0,7$ e PVAT-: $10,5 \pm 0,9$). O delta de redução da E_{MAX} foi maior no grupo dh-SD quando comparado ao grupo c-SD ($6,3 \pm 1,5$ e $2,7 \pm 0,7$, respectivamente) e o treinamento aeróbio foi eficaz em restabelecer esses valores no grupo dh-TR ($4,5 \pm 0,6$). Não observamos diferença no peso do PVAT entre os grupos c-TR e dh-TR. Nenhuma alteração nos valores de pEC_{50} foi observada para todos os grupos (Figura 13, Tabela 5).

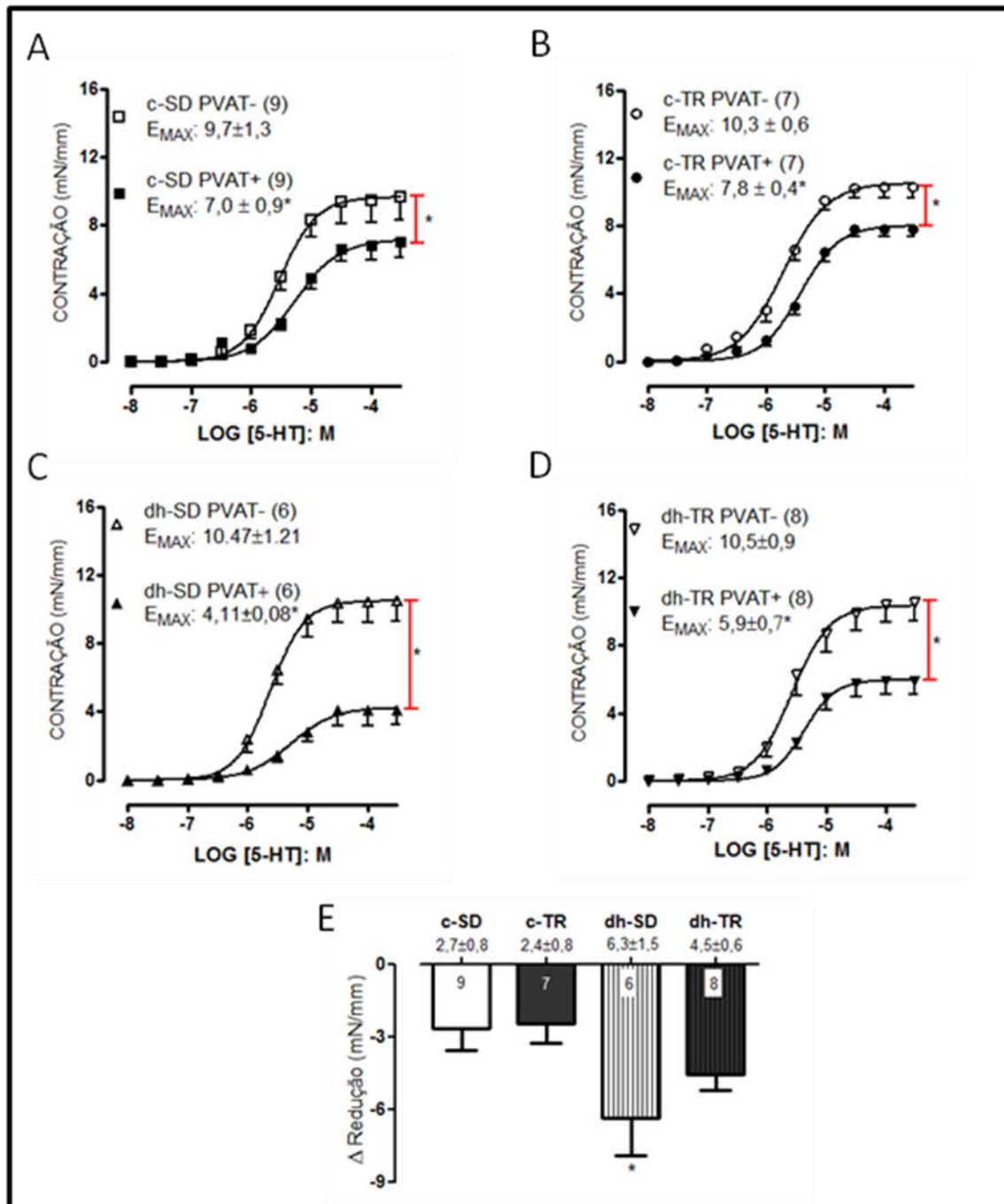


Figura 13: Curvas concentração-resposta à serotonina (5-HT) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD, painel A), controle treinado (c-TR, painel B), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD, painel C) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR, painel D). Delta de redução da E_{MAX} na presença do PVAT (painel E). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. E_{MAX} : Resposta máxima. Valores expressos em média \pm SEM. Test t Student: * $p < 0,05$ comparado ao respectivo anel PVAT- (painéis A, B, C, D). ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; + $p < 0,05$ comparado ao dh-SD (painéis E).

Tabela 5: Valores de potência (pEC_{50}) obtidas a partir de curvas concentração-resposta à fenilefrina (PHE) e serotonina (5-HT) em anéis de aorta na ausência (PVAT-) ou na presença (PVAT+) do tecido adiposo perivascular de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR).

		GRUPOS - pEC_{50}			
		c-SD	c-TR	dh-SD	dh-TR
PHE	PVAT+	6,38±0,07	6,34±0,10	6,12±0,10	6,37±0,10
	PVAT-	6,62±0,08	6,54±0,03	6,62±0,12	6,53±0,08
5-HT	PVAT+	5,27±0,07	5,33±0,01	5,32±0,08	5,37±0,01
	PVAT-	5,53±0,07	5,65±0,06	5,62±0,05	5,56±0,10

Valores de potência são representados como $-\log$ da concentração do agonista necessária para produzir 50 % da resposta máxima. Valores expressos como média \pm SEM. Teste *t Student*. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni.

5.5- Expressão de proteínas

A expressão da iNOS no tecido adiposo perivascular não foi alterada pelo treinamento físico no grupo c-TR quando comparado ao grupo c-SD. Similarmente, no grupo dh-SD a expressão da iNOS foi aumentada comparada ao grupo c-SD, e o treinamento físico foi capaz de reduzir estes valores no grupo dh-TR (Figura 14, painel A).

O treinamento físico não alterou a expressão da eNOS no grupo c-TR quando comparado ao c-SD. Interessantemente, os animais do grupo dh-SD apresentaram aumento na expressão da eNOS comparado ao grupo c-SD. Por outro lado, o treinamento físico reduziu esta expressão no grupo dh-TR (Figura 14, painel B)

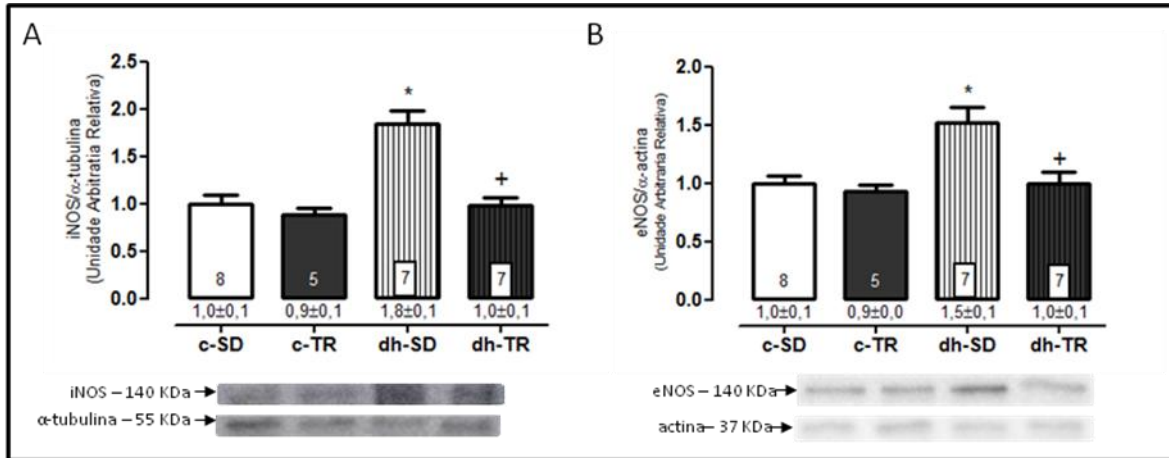


Figura 14. Expressão da sintase endotelial do óxido nítrico na aorta (eNOS, painel A) e da sintase induzível do óxido nítrico no tecido adiposo perivascular (iNOS, painel B) de ratos dos grupos: controle sedentário (c-SD), controle treinado (c-TR), dieta hiperlipídica sedentário (dh-SD) e dieta hiperlipídica treinado (dh-TR). O número de animais utilizados para cada grupo foi inserido na figura. Valores relativos ao grupo c-SD e expressos em média \pm SEM. ANOVA duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni: * $p < 0,05$ comparado ao c-SD; ⁺ $p < 0,05$ comparado ao dh-SD.

6.0-DISCUSSÃO

Trabalhos que envolvem a indução de obesidade por dieta em modelos animais são relevantes para a compreensão dos mecanismos pelos quais a obesidade promove alterações metabólicas e cardiovasculares. Além disso, esses modelos apresentam grande semelhança com a etiologia da obesidade em seres humanos, mostrando-se de grande utilidade na área de saúde (WEST e YORK, 1998; TSCHOP e HEIMAN, 2001). Demonstramos que o tecido adiposo perivascular apresentou importante efeito anticontrátil aos agonistas fenilefrina e serotonina em aorta torácica de ratos. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica exacerbou o efeito anticontrátil apenas ao agonista serotonina, e o treinamento físico aeróbico foi eficaz em prevenir esta alteração.

Em nosso estudo, ratos alimentados por dezesseis semanas com dieta hiperlipídica e sedentários (dh-SD) apresentaram alterações características da obesidade como aumento no ganho de peso corporal, acúmulo de gordura epididimal e níveis elevados de triglicerídeos, insulina e leptina circulantes. Outros trabalhos também encontraram maior ganho de peso corporal, gordura epididimal e triglicerídeos (ESTADELLA et. al., 2004; DE MOARES et. al., 2007; DE MORAES et. al., 2008; PAULI et. al., 2009; MONTEIRO et. al., 2012; WANG et. al., 2014), bem como altos níveis plasmáticos de insulina e leptina (YASARI et. al., 2009; AILHAUD, 2006; GAUTHIER et. al., 2004; PELLIZZON et. al., 2002; KOWALSKA et. al. 1999). A distribuição da gordura corporal exerce grande influência nas anormalidades associadas à obesidade, tais como alterações no metabolismo glicêmico e lipídico, sendo estas mais encontradas em condições que exista obesidade central (abdominal) (LAFONTAN e LANGIN, 2009). A ingestão de dieta hiperlipídica está associada à resistência à insulina, com consequente hiperinsulinemia e desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 (BODEN, 1997; CINTRA et. al., 2008; PAULI et. al., 2008).

Os efeitos deletérios da obesidade têm sido associados com o desenvolvimento de um estado crônico de inflamação, com aumento na produção de liberação de fatores pró-inflamatórios. As adipocinas produzidas pelo tecido adiposo branco estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos, entre eles o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, sensibilidade à insulina, a angiogênese, proteção vascular, regulação da pressão arterial, coagulação sanguínea e resposta inflamatória (HAUNER, 2004; RAJSHEKER et. al., 2010). Evidências demonstraram correlação positiva dos altos níveis de leptina com maior

acúmulo de gordura, principalmente do tecido adiposo branco, tanto em modelos de obesidade em roedores (DE LAS HERAS et. al., 2009; YASARI et. al., 2009; AILHAUD, 2006; GAUTHIER et. al., 2004; PELLIZZON et. al., 2002; KOWALSKA et al. 1999) como em humanos (BELTOWSKI, 2006; PORRECA et. al., 2004; GUZIK et. al., 2003).

O exercício físico aeróbio de moderada intensidade promove efeitos benéficos em diversos sistemas fisiológicos, sendo recomendado para a prevenção das doenças crônicas degenerativas, incluindo a hipertensão arterial, diabetes mellitus, aterosclerose e obesidade (ACSM, 2007). Sua prática regular está associada à promoção de saúde, melhora na função cardiovascular e retardo das complicações associadas ao envelhecimento em animais saudáveis (JUDGE et. al., 2005; GARCIA-VALLES et. al., 2013). Diversos estudos reportam que o exercício físico de moderada intensidade realizado sistematicamente de três a cinco vezes/semana promove redução no ganho de peso corporal e do acúmulo de gordura, além de melhorar o perfil lipídico e glicídico (SCHRAUWEN et. al., 2000; GAUTHIER et. al., 2003; DIZDAR et. al., 2004; BURNEIKO et. al., 2006).

No presente estudo, o treinamento físico de moderada intensidade em animais controle (c-TR), durante oito semanas, foi eficaz em promover menor ganho de peso corporal e redução da gordura epididimal quando comparado ao seu respectivo grupo controle (c-SD), demonstrando eficiência do treinamento físico empregado no controle do ganho de peso e acúmulo de gordura. Interessantemente quando comparamos os resultados do grupo treinado e alimentado com dieta hiperlipídica (dh-TR) com o seu respectivo grupo sedentário (dh-SD), observamos não somente redução do ganho de peso corporal e gordura epididimal como também, valores reduzidos de triglicerídeos, insulina e leptina. Sabe-se que o exercício físico pode modular o ganho de peso corporal por estar relacionado ao aumento do gasto energético, aumento da atividade simpática, ativação de receptores beta-adrenérgicos, ativação da lipase hormônio-sensível (HSL), aumento da lipólise e beta-oxidação na mitocôndria (HOROWITZ, 2003; LJUBICIC et. al., 2010; THOMPSON et. al., 2012; CICCARELLI et. al., 2013; TURNER et. al., 2014). Adicionalmente, estudos têm demonstrado efeitos benéficos do exercício físico na redução dos níveis de triglicerídeos em humanos (TALAYERO e SACKS, 2011; ADENIYI et. al., 2013; BELLOU et. al., 2013; PAOLI et. al., 2013). Alguns mecanismos têm sido sugeridos para explicar a melhora no perfil lipídico promovido pelo exercício, sendo eles o aumento da lipólise e utilização de lipídeos como fonte de energia, elevação da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) levando ao

aumento da lipoproteína lipase (LPL) e quebra dos triglicerídeos, além do aumento da expressão de RNAm envolvendo PPAR- γ , LPL e HSL no tecido adiposo (RUSCHKE et. al., 2010; TSENG et. al., 2013; KIM et. al., 2014; TURNER et. al., 2014). Por sua vez, a leptina interage com diferentes sistemas neuroendócrinos centrais, envolvidos no controle da ingestão de alimentos, regulação do apetite e gasto energético (CARO et. al., 1996; MONTAGUE et. al., 1997; GUIMARAES et. al., 2007). Outros estudos também reportaram redução na concentração plasmática de leptina promovida pelo exercício aeróbio em humanos (TIRAYAKI-SONMEZ et. al., 2013) e em camundongos (BRADLEY et. al., 2008), bem como, redução na expressão de RNAm para leptina no tecido adiposo branco (ZACHWIEJA et. al., 1997; GOLLISCH et. al., 2009; VIEIRA et. al., 2009).

Observamos também aumento do PVAT nos animais dh-SD comparado ao grupo c-SD. O exercício físico aeróbio em ambos os grupos c-TR e dh-TR foi eficaz em reduzir a massa do PVAT, comparado aos grupos sedentários. Esta redução pode estar associada a modificações no metabolismo do PVAT promovida pelo exercício físico. O PVAT encontrado na aorta é considerado tecido adiposo misto branco (TAB) e marrom (TAM), porém com maior semelhança com o TAM, por possuir células adiposas multiloculares, abundância em mitocôndrias e significativa expressão de UCP-1 (FITZGIBBONS et. al., 2011; ARAUJO et. al., 2015). Também foi demonstrado que em ratos submetido à dieta hiperlipídica a massa total do PVAT está aumentada (KADOWAKI e YAMAUCHI et. al., 2005; MARCHESI et. al., 2009; MA et. al., 2010).

Relacionado à reatividade vascular, o PVAT não alterou a resposta vasodilatadora induzida pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio, em todos os grupos estudados. Interessantemente, também não observamos alterações induzidas pela dieta hiperlipídica ou pelo treinamento físico aeróbio no relaxamento dependente de endotélio. Outros estudos evidenciaram resultados similares aos encontrados, sendo realizados em aorta torácica de camundongos e também artéria coronária de suínos (REIFENBERGER et. al., 2007; BUNKER et. al., 2010; KETONEN et. al., 2010). Os quadros de obesidade podem ser divididos em duas categorias, aqueles que apresentam controle metabólico ligeiramente disfuncional e aqueles que apresentam controle metabólico completamente disfuncional. É interessante salientar, que a primeira categoria de fenótipo metabólico possuem níveis moderados de marcadores inflamatórios, bem como menor risco de comprometimento cardiovascular quando comparados a

segunda categoria (APOVIAN et. al., 2008; OUCHI et. al., 2011). Acreditamos que em nosso estudo os animais ainda apresentem um quadro de obesidade (aumento do peso corporal e gordura epididimal) com moderada disfunção metabólica, com prejuízo no controle metabólico (níveis elevados de triglicerídeos e insulina circulantes), aumento da inflamação (níveis elevados de leptina circulante), porém conforme evidenciado ainda não apresentam disfunção endotelial na aorta torácica. No entanto, os mecanismos envolvidos são complexos devem ser futuramente investigados.

Por outro lado, a resposta vasoconstritora induzida pelos agentes fenilefrina e serotonina foi reduzida na presença do PVAT, demonstrando assim efeito anticontrátil na reatividade vascular de aorta torácica. Diferentes estudos previamente evidenciaram esta resposta em protocolos envolvendo animais e seres humanos (LOHN et. al., 2002; DUBROVSKA et. al., 2004; GAO et. al., 2005; LEE et. al. 2009). Os mecanismos pelos quais o PVAT promove este efeito anticontrátil é complexo e envolve diversas vias de sinalização. Estudos evidenciaram que o PVAT produz um fator relaxante derivado do adipócito (ADRF) que pode promover a abertura de canais de K^+ dependentes de ATP, canais de K^+ dependentes de voltagem, e ainda canais de K^+ ativados por cálcio de baixa condutância, causando hiperpolarização das células do músculo liso vascular e relaxamento (LOHN et. al., 2002; VERLOHREN et. al., 2004; GAO et. al., 2007). Outros trabalhos demonstraram o envolvimento da liberação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas células do PVAT, promovendo a formação de GMPc e relaxamento vascular (GAO et. al., 2007; WANG e SCHEDER, 2008). Foi demonstrado que a leptina possui efeito direto no relaxamento vascular, mesmo na ausência do PVAT, em artéria mesentérica de cães (MOHAMMED et. al., 2007), aorta de coelhos (SAHIN e BARISKANER, 2007) e em humanos (NAKAGAWA et. al., 2002), esta resposta é mediada por mecanismos dependentes de NO (RAHMOUNI e HAYNES, 2005; SAHIN et. al., 2007) e mais recente estudo sugere que a leptina é capaz de estimular a produção NO no PVAT da artéria mesentérica de camundongos (GIL-ORTEGA et. al., 2010). Acredita-se que a ativação de receptores β_3 adrenérgicos no PVAT possa promover a liberação de adiponectina, que atua em seu receptor nas células do músculo liso vascular promovendo hiperpolarização e relaxamento (KADOWAKI e YAMAUCHI 2005; AGHAMOHAMMADZADEH et. al., 2012). Por fim, a fenilefrina e serotonina, atuando em receptores específicos do PVAT podem estimular a produção de NO via

NOS e consequente relaxamento da célula muscular lisa (MALINOWSKI et. al., 2008; AGHAMOHAMMADZADEH et. al., 2012)

Em especial, diferentes modelos de indução de obesidade em animais com severa disfunção metabólica bem como exacerbado aumento do PVAT, demonstraram perda do efeito anticontrátil promovido pelo PVAT (GIL-ORTEGA et. al., 2009; MA et. al., 2010; PAYNE et. al., 2010). No entanto, estudos que avaliaram indução de obesidade em quadros com disfunção metabólica moderada observaram aumento da produção de NO pelo PVAT e melhora na função vascular como um mecanismo compensatório do estágio inicial da obesidade (GIL-ORTEGA et. al., 2010; FERNÁNDEZ-ALFONSO et. al., 2013). Em nosso estudo, a redução da contratilidade vascular à fenilefrina foi similar em todos os grupos na presença do PVAT, porém houve uma maior redução na resposta à serotonina nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e o treinamento aeróbio foi eficaz em prevenir esta alteração.

A fenilefrina ativa receptores adrenérgicos do tipo alfa-1, presentes nas células do músculo liso que é acoplado a proteína G, e quando ativado estimula a fosfolipase C, catalisando a formação de DAG e IP₃. O IP₃, quando se liga nos seus receptores no retículo sarcoplasmático, aumenta liberação Ca²⁺ do retículo. O DAG e o Ca²⁺ ativam a PKC que fosforila a proteína CPI-17, umas das responsáveis pela inibição da fosfatase da cadeia leve de miosina, contribuindo com a contração, além disso, a PKC também atua sobre os canais de cálcio do tipo L, colaborando com o aumento da concentração de Ca²⁺ no citosol (WEBB, 2003; DIMOPOULOS et. al., 2007).

Por sua vez, a serotonina (5-HT) possui uma diversidade de subtipos de receptores, bem como complexas vias de sinalizações envolvidas nas respostas. Os subtipos podem ser divididos em sete famílias, sendo elas, 5-HT₁ (5-HT_{1A}; 5-HT_{1B}; 5-HT_{1D}; 5-HT_{1E}; 5-HT_{1F}), 5-HT₂ (5-HT_{2A}; 5-HT_{2B}; 5-HT_{2C}), 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ que são acopladas a proteína G e os receptores da família 5-HT₃ são canais iônicos associados a 5-HT (HOYER et. al., 2002). Estes receptores estão presentes não apenas em células do músculo liso vascular, mas também em células do tecido adiposo (ULLMER et. al., 1995; UCHIDA-KITAJIMA et. al., 2008; STUNES et. al., 2011). Especificamente, o receptor 5-HT_{2A} presente nas células do músculo liso vascular, quando ativados pela 5-HT promovem a contração muscular devido à ativação da via de sinalização que envolve IP₃/PKC e aumento de Ca²⁺ no citosol, bem como, o mecanismo de sinalização envolvendo Rho-quinase e inibição da fosfatase da cadeia leve de miosina (GAMOH et. al.,

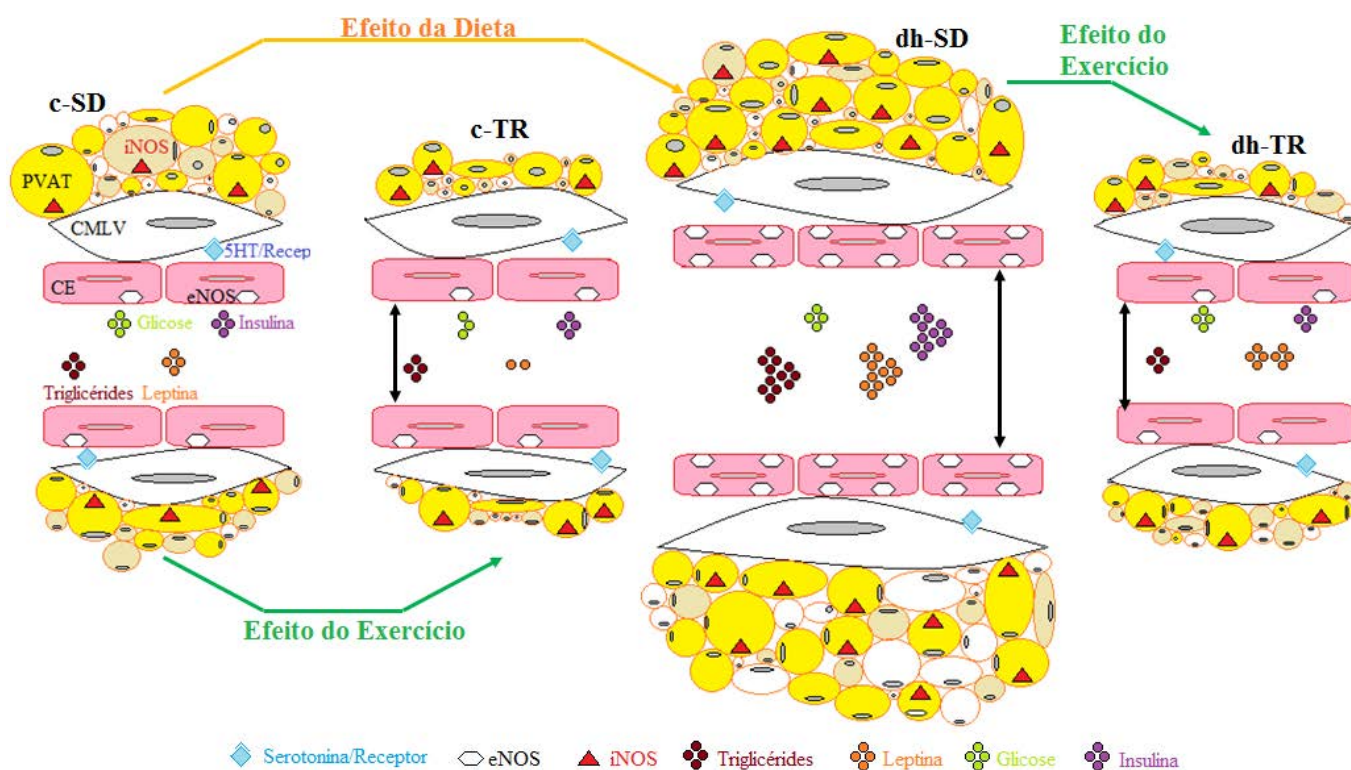
2013). Os receptores 5-HT_{1B} inibem a adenilato ciclase (AMPC), quando localizados nas células do músculo liso vascular promovem a vasoconstrição (NILSSON et. al., 1999; BANES e WATTS 2001; MONASSIER et. al., 2010; WATTS et. al., 2012). Por outro lado, foi demonstrado que receptores do tipo 5-HT_{1B} localizados nas células endoteliais podem induzir a vasodilatação através da produção de NO (HOYER et. al., 1994).

Por fim, observamos aumento na expressão da eNOS na aorta e iNOS no PVAT dos animais do grupo dh-SD, comparado aos demais grupos estudados. Em recente estudo realizado em camundongos foi demonstrado aumento da produção de NO pelo PVAT na fase inicial da obesidade, sendo considerado um possível efeito adaptativo (GIL-ORTEGA et. al., 2010). A iNOS foi originalmente identificada em macrófagos e sua atividade e expressão estão relacionadas com o sistema imune e aumento do estado inflamatório celular (MACMICKING et al., 1995; MCNEILL et. al., 2014). A literatura tem demonstrado em modelos animais a associação entre obesidade, estado inflamatório subclínico e liberação de adipocinas pró-inflamatória como leptina, TNF- α , IL-6, resistina, além do aumento da expressão da iNOS no tecido adiposo (BOULOUMIÉ et. al., 2005; LYON et. al. 2003; YOO e CHOI, 2014; PERREAULT e MARETTE, 2001). Uma característica importante da iNOS é a sua grande capacidade de produzir NO (MORRIS e BILLIAR, 1994.; MONCADA e HIGGS, 2006). Acreditamos que uma possível sinalização dos receptores de serotonina no PVAT pode modular a produção de NO via iNOS, podendo estar relacionado com o aumento do efeito anticontrátil observado no grupo dh-SD, sendo uma via compensatória e adaptativa da fase inicial da obesidade. O exercício físico foi capaz de reduzir a expressão da eNOS na aorta e iNOS no PVAT, associado a normalização do efeito anticontrátil do PVAT no grupo dh-TR. Estudos tem demonstrado que o exercício físico diminui os níveis TNF- α , IL-6 e IL-1 β , tanto em animais quanto em humanos (GOLLASCH et. al., 2004; VIEIRA et. al., 2009; SAKURAI et. al., 2009), diminuindo o estado inflamatório e possivelmente reduzindo fatores de transcrição envolvidos na expressão da iNOS no PVAT. Futuros experimentos devem ser realizados visando investigar os possíveis mecanismos envolvidos na sinalização da 5-HT em receptores presentes no PVAT da aorta torácica e seu efeito anticontrátil no músculo liso vascular.

7.0-CONCLUSÃO

Concluimos que o tecido adiposo perivascular apresentou efeito anticontrátil aos agonistas fenilefrina e serotonina em aorta torácica de ratos. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica exacerbou o efeito anticontrátil apenas ao agonista serotonina, sendo um possível efeito adaptativo na fase inicial da obesidade e o treinamento físico aeróbio foi eficaz em prevenir esta alteração.

8.0-SUMÁRIO DOS RESULTADOS



9.0-REFERENCIAS

1. ADENIYI, A.F.; ULOKO, A.E.; OGWUMIKE, O.O.; SANYA, A.O.; FASANMADE, A.A. Time course of improvement of metabolic parameters after a 12 week physical exercise programme in patients with type 2 diabetes: the influence of gender in a Nigerian population. **Biomed Res Int**, n. 310474, [s.v.], [s.p.], 2013.
2. 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. **Br J Pharmacol**, v. 165, n. 3, p. 670-682, fev 2012.
3. AILHAUD G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. **C R Biol.**, n. 329, v. 8, p. 570-7, aug 2006.
4. APOVIAN, C. M.; BIGORNIA, S.; MOTT, M.; MEYERS, M. R.; ULLOOR, J.; GAGUA, M.; MCDONNELL, M.; HESS, D.; JOSEPH, L.; GOKCE, N. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, n. 28, v. 9, p. 1654-9, sep 2008.
5. ARAUJO, H. N.; DA SILVA, C. P. V.; SPONTON, A. C. S.; CLERICI, S. P.; DAVEL, A. P. C.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A.; DELBIN, M. A. Perivascular adipose tissue and vascular responses in healthy trained rats. **Life Sciences**, n. ,v. , p. , jan 2015.
6. BANES, A. K.; WATTS, S. W. Enhanced contraction to 5-hydroxytryptamine is not due to “unmasking” of 5-hydroxytryptamine (1b) receptors in the mesenteric artery of the oxycorticosterone acetate-salt rat. **Hypertension**, n. 38, v. 4, p. 891-4, oct 2001.
7. BELLOU, E.; SIOPI, A.; GALANI, M.; MARAKI, M.; TSEKOURAS, Y.E.; PANAGIOTAKOS, D.B.; KAVOURAS, S.A.; MAGKOS, F.; SIDOSSIS, L.S. Acute effects of exercise and calories restriction on triglycerid e metabolism in women. **Med Sci Sports Exerc**, n. 45, v. 3, p. 455-61, mar 2013.
8. BELTOWSKI, J. Leptin and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, n. 189, n. 1, p. 47-60, nov 2006.
9. BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease. **Circ Res**, v. 96, n. 9, p. 939-949, mai 2005.

10. BODE-BÖGER, S.M.; SCALERA, F.; IGNARRO, L.J. The l-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. **Pharmacol Ther.** v. 114, n. 3, p. 294-306, jun 2007.
11. BODEN, G.; CHEN, X.; KOLACZYNSKI, J. W.; POLANSKY, M. Effects of prolonged hiperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest.*, n. 100, v. 5, p. 1107-13, sep 1997.
12. BOULOUMIÉ, A.; CURAT, C.A.; SENGENÈS, C.; LOLMÈDE, K.; MIRANVILLE, A.; BUSSE, R. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, n. 8, v. 4, p. 347-54, jul 2005.
13. BOULOUMIE, A.; MARUMO, T.; LAFONTAN, M.; BUSSE, R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. **FASEB J.**, n. 13, v. 10, p. 1231-8, jul 1999.
14. BRADLEY, R.L.; JEON, J.Y.; LIU, F.F. MARATOS-FLIER, E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, n. 294, v. 3, p. 586-94, sep 2008.
15. BROOKS, G .A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol**, v. 45, n. 6, p. 1009-1015, dez 1978.
16. BRUUN, J.M.; HELGE, J.W.; RICHELSEN, B.; STALLKNECHT, B. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, n. 290, v. 5, p. 961-7, may 2006.
17. BUNKER, A. K.; LAUGHLIN, M. H. Influence of exercise and perivascular adipose tissue on coronary artery vasomotor function in a familial hypercholesterolemic porcine atherosclerosis model. **J Appl Physiol**, v. 108, n. 3, p. 490-497, mar 2010.
18. BURNEIKO, R. C.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; RODRIGUES, H. G.; EBAID, G. M.; FAINE, L. A.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C.; NOVELLI, E. L. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food Chem Toxicol.**, n. 44, v. 7, p. 1167-72, jul 2006.
19. CARO, J. F.; SINHA, M. K.; KOLACZYNSKI, J. W.; ZHANG, P. L.; CONSIDINE, R. V. Leptin: the tale of an obesity gene. **Diabetes**, n. 45, v. 11, p. 1455-62, nov 1996.
20. CHRISTIANSEN, T.; PAULSEN, S.K.; BRUUN, J.M.; PEDERSEN, S.B.; RICHELSEN, B. Exercise training versus diet-induced weight-loss on metabolic risk factors and

- inflammatory markers in obese subjects: a 12-week randomized intervention study. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, n. 298, v. 4, p. 824-31, apr 2010.
21. CICCARELLI, M.; SANTULLI, G.; PASCALE, V.; TRIMARCO, B.; IACCARINO, G. Adrenergic receptors and metabolism: role in development of cardiovascular disease. **Front Physiol.**, n. 265, v. 4, p. 1-5, oct 2013.
 22. CINTRA, D. E.; PAULI, J. R.; ARAÚJO, E. P.; MORAES, J. C., DE SOUZA, C. T.; MILANSKI, M.; MORARI, J.; GAMBERO, A.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **J Hepatol.**, n. 48, v. 4, p. 628-37, apr 2008.
 23. CIOLAC, E. G.; GUIMARÃES, G. V. Exercício físico e síndrome metabólica. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 319-324, jul./ago. 2004.
 24. CONTI, V.; RUSSOMANO, G.; CORBI, G.; IZZO, V.; VECCHIONE, C.; FILIPPELI, A. adrenoceptors and nitric oxide in the cardiovascular system. **Front Physiol.**, n. 321, v. 04, p. 01-11, nov 2013.
 25. DASHWOOD, M. R.; DOOLEY, A.; SHI-WEN, X.; ABRAHAM, D. J.; SOUZA, D. S. R. Does Periadventitial Fat-Derived Nitric Oxide Play a Role in Improved Saphenous Vein Graft Patency in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery?. **J Vasc Res**, v. 44, n. 3, p.175-181, abr 2007.
 26. DE LAS HERAS, N.; MARTÍN-FERNÁNDEZ, B.; MIANA, M.; BALLESTEROS, S.; OUBIÑA, M. P.; LÓPEZ-FARRÉ, A. J.; CACHOFEIRO, V.; LAHERA, V. The protective effect of irbesartan in rats fed a high fat diet is associated with modification of leptin-adiponectin imbalance. **J Hypertens Suppl.**, n. 27, v. 6, p. 37-41, aug 2009.
 27. DE MORAES, C.; DAVEL, A. P.; ROSSONI, L.V.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physiology (Online)**, v. 8, p. 1-8, mai 2008.
 28. DE MORAES, C.; CAMARGO, E.; ANTUNES, E.; DENUCCI, G.; ZANESCO, A. Reactivity of mesenteric and aortic rings from trained rats fed with high caloric diet?. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 788-792, jul 2007.

29. DELBIN, M. A.; ZANESCO, A. Sistemas Cardiovascular. In: Zanesco, A; Puga, G., editores. **Doenças Cardiometabólicas e Exercícios Físico**. Rio de Janeiro: Revinter; 2013. p. 81-94.
30. DIMOPOULOS, G. J.; SEMBA, S.; KITAZAWA, K.; ETO, M.; KITAZAWA, T. Ca^{2+} -Dependent Rapid Ca^{2+} -Sensitization of Contraction in Arterial Smooth Muscle. **Circ Res.**, v. 1, n. 100, p. 121-9, jan 2007.
31. DIMOPOULOS, G.J.; SEMBA, S.; KITAZAWA, K.; ETO, M.; KITAZAWA, T. Ca^{2+} -dependent rapid Ca^{2+} sensitization of contraction in arterial smooth muscle. **Circ Res**, n. 100, v. 1, p. 121-29, jan 2007.
32. DUBROVSKA, G.; VERLOHREN, S.; LUFT, F. C.; GOLLASCH, M. Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue. **Am J Physiol Heart Circ**, v. 286, n. 3, p. 1107-1113, mar 2004.
33. DUONG-QUY, S.; BEI, Y.; LIU, Z.; DINH-XUAN, A. T. Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension. **Pharmacol Ther.**, v. 3, n. 137, p. 352-64, mar 2013.
34. ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; DÂMASO, A. R.; RIBEIRO, E. B.; OLLER, C. M N. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 218- 224, fev 2004.
35. 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. **J Hypertens**, v. 27, n. 11, p. 2174-2185, nov 2009.
36. FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S.; GIL-ORTEGA, M.; GARCÍA-PRIETO, C.F.; ARANGUEZ, I.; RUIZ-GAYO, M.; SOMOZA, B. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **Int J Endocrinol**, [sn], [sv], [sp], 2013.
37. FÉSUS, G.; DUBROVSKA, G.; GORZELNIAK, K.; KLUGE, R.; HUANG, Y.; LUFT, F. C.; GOLLASCH, M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 4, p. 719-727, set 2007.
38. FISHER, A. B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A. I.; NEREM, R. M. Endothelial cellular response to altered shear stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 281, n. 3, p. 529-533, set 2001.
39. FITZGIBBONS, T. P.; KOGAN, S.; AOUADI, M.; HENDRICKS, G.M.; STRAUBHAAR, J.; CZECH, M. P. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissue and their

- resistance to diet-induced inflammation. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 4, n. 301, p1425-37, oct 2011.
40. FREDERICO, M.J.; JUSTO, S.L.; DA LUZ, G.; DA SILVA, S.; MEDEIROS, C.; BARBOSA, V. A.; SILVA, L. A.; BOECK, C. R.; DE PINHO, R. A.; DE SOUZA, C. T. Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reative oxygen species in rats submitted to myocardial infartion induced by isoproterenol. **Free Radic Res.**, n. 43, v. 10, p. 957-64, oct 2009.
 41. FUKAI, T.; SIEGFRIED, M. R.; USHIO-FUKAI, M.; CHENG, Y.; KOJDA, G.; HARRISON, D. G. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **J Clin Invest.**, n. 105, v. 11, p. 1631-9, jun 2000.
 42. GÁLVEZ-PRIETO, B.; BOLBRINKER, J.; STUCCHI, P.; HERAS, A. I.; MERINO, B.; ARRIBAS, S.; RUIZ-GAYO, M.; HUBER, M.; WEHLAND, M.; KREUTZ, R.; FERNANDEZ-ALFONSO, M. S. Comparative expression analysis of the renin–angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue **J Endocrinol**, v. 197, n. 1, p. 55-64, abr 2008.
 43. GÁLVEZ-PRIETO, B.; DUBROVSKA, G.; CANO, M.V.; DELGADO. M.; ARANGUEZ, I.; GONZÁLEZ, M.C.; RUIZ-GAYO, M.; GOLLASCH, M.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S. A reduction in the amount and anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res**, n. 31, v. 7, p. 1415-23, jul 2008.
 44. GAMOH, S.; HISA, H.; YAMAMOTO, R. 5-hydroxytryptamine receptors as targets for drug therapies of vascular-related diseases.**Biol Pharm Bull.**, n. 36, v. 9, p. 1410-5, 2013.
 45. GAO, Y. J.; LU, C.; SU, L.Y.; SHARMA, A. M.; LEE, R. M. K. W. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **Br J Pharmacol**, v. 151, n. 3, p. 323-331, jun 2007.
 46. GAO, Y. J.; LU, C.; SU, L.Y.; SHARMA, A. M.; LEE, R. M. K. W. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **Br J Pharmacol**, v. 151, n. 3, p. 323-331, jun 2007.
 47. GAO, Y.J.; ZENG, Z.H.; TEOH, K.; SHARMA, A.M.; ABOUZAHR, L.; CYBULSKY, I.; LAMY, A.; SEMELHAGO, L.; LEE, R.M. Perivascular adipose tissue modulates vascular

function in the human internal thoracic artery. **J Thorac Cardiovasc Surg**, n. 130, v. 4, p. 1130-6, oct 2005.

48. GARCIA-VALLES, R.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; RODRIGUEZ-MAÑAS, L.; GARCIA-GARCIA, F. J.; DIAZ, A.; NOGUERA, I.; OLASO-GONZALEZ, G.; VIÑA, J. Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but improves health span in mice. **Longev Healthspan.**, n. 2, v. 1, [s.p.], sep 2013.
49. GAUTHIER, M. S.; COUTURIER, K.; LATOUR, J. G.; LAVOIE, J. M. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induce macrovesicular hepatic steatosis. **J Appl Physiol (1985)**, n. 94, v. 6, p. 2127-34, jun 2003.
50. GAUTHIER, M.S.; COUTURIER, K.; CHARBONNEAU, A.; LAVOIE, J. M. Effects of introducing physical training in the course of a 16-week high-fat diet regimen on hepatic steatosis, adipose tissue fat accumulation, and plasma lipid profile. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, n. 28, v. 8, p. 1063-71, aug 2004.
51. GIL-ORTEGA, M.; SOMOZA, B.; ARANGUEZ, I.; RUIZ-GAYO, M.; FERNANDEZ-ALFONSO, M. S. Changes in resistance artery function during the development of diet-induced obesity. **Hypertension**, vol. 54, no. 4, pp. 105–106, 2009.
52. GIL-ORTEGA, M.; STUCCHI, P.; GUZMÁN-RUIZ, R.; CANO, V.; ARRIBAS, S.; GONZÁLEZ, M. C.; RUIZ-GAYO, M.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M. S.; SOMOZA, B. Adaptative nitric oxide overproduction in perivascular adipose tissue during early diet-induced obesity. **Endocrinology**, n. 151, v.7, p. 3299-306, jul 2010.
53. GOLLASCH, M.; DUBROVSKA, G. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 12, p. 647-653, dez 2004.
54. GOLLISCH, K. S.; BRANDAUER, J.; JESSEN, N.; TOYODA, T.; NAYER, A.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal-and high-fat diet-fed rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, n. 298, v. 2, p. 495-504, aug 2009.
55. GUIMARÃES, D. E. D.; SARDINHA, F. L. C.; MIZURINI, D. M.; CARMO, M. G. T. Adipokines: a new view of adipose tissue. **Rev. Nutr**, n. 20, v. 5, p. 549-559, 2007.
56. GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol.**, n. 54, v. 4, p. 469-87, dec 2003.

57. HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiol Behav.**, n. 83, v. 4, . 653-8, dec 2004.
58. HOROWITZ, J. F. Fatty acid mobilization from adipose tissue during exercise. **Trends Endocrinol Metab.**, n. 14, v. 8, p. 386-92, oct 2003.
59. HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5ht-receptors. **Pharmacol Biochem Behav.**, n. 71, v. 4, apr 2002.
60. IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84, n. 24, p. 9263-1, dec 1987.
61. IGNARRO, L.J.; NAPOLI, C. Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep.** v. 6, n. 4, p. 281-7, jul 2004.
62. JUDGE, S.; JANG, Y. M.; SMITH, A. SELMAN, C.; PHILLIPS, T.; SPEAKMAN, J. R.; HAGEN, T.; LEEUWENBURGH, C. Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, n. 29, v. 6, p. 1564,72, dec 2005.
63. KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. **Endocr Rev**, v. 26, n. 3, p. 439-451, mai 2005.
64. KETONEN, J.; SHI, J.; MARTONEN, E.; MERVAALA, E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57BI/6 mice. **Circ J.**, n. 74, v. 7, p. 1479-87, jul 2010.
65. KNUDSON, J. D.; DINCER, U. D.; DICK, G. M.; SHIBATA, H.; AKHANE, R.; SAITO, M.; TUNE, J. D. Leptin resistance extends to the coronary vasclature in prediabetic dogs and provides a protective adaptation against endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, n. 289, v. 3, p. 1038-46, sep 2005.
66. KOHUT, M.L.; MCCANN, D.A.; RUSSELL, D.W.; KONOPKA, D.N.; CUNNICK, J.E.; FRANKE, W.D.; CASTILLO, M.C.; REIGHARD, A.E.; VANDERAH, E. Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. **Brain Behav Immun.**, n. 20, v. 3, p. 201-9, may 2006.

67. KOJDA, G.; HAMBRECH, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res*, v. 67, n. 2, p. 187-197, ago 2005.
68. KONDO, T.; KOBAYASHI, I.; MURAKAMI, M. Effect of exercise on circulating adipokine levels in obese young women. *Endocr J.*, n. 53, v. 2, p. 189-95, apr 2006.
69. KORDA, M.; KUBANT, R.; PATTON, S. MALINSKI T. Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, n. 294, v. 4, p. 1514-21, oct 2008.
70. KOWALSKA, I.; STRACZKOWSKI, M.; GÓRSKI, J.; KINALSKA, I. The effect of fasting and physical exercise on plasma leptin concentrations in high-fat fed rats. *J Physiol Pharmacol.*, n. 50, v. 2, p. 309-20, jun 1999.
71. LAFONTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res.*, n. 48, v. 5, p. 275-97, sep 2009.
72. LEE, R.M.; LU, C.; SU, L.Y.; WERSTUCK, G.; GAO, Y.J. Effects of hyperglycemia on the modulation of vascular function by perivascular adipose tissue. *J Hypertens*, n. 27, v. 1, p. 118-31, jan 2009.
73. LJUBICIC, V.; JOSEPH, A. M.; SALEEM, A.; UGUCCIONI, G.; COLLU-MARCHESE, M.; LAI, R. Y.; NGUYEN, L. M.; HOOD, D. A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta.*, n. 1800, v. 3, p. 223-34, mar 2010.
74. LÖHN, M.; DUBROVSKA, G.; LAUTERBACH, B.; LUFT, F. C.; GOLLASCH, M.; SHARMA, A. M. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB*, v. 16, n. 9, p. 1057-1063, jul 2002.
75. LYON, C.J.; LAW, R.E.; HSUEH, W.A. Minireview: adiposity, inflammation and atherogenesis. *Endocrinology*, n. 144, v. 6, p 2194-200, jun 2003.
76. MA, L.; MA, S.; HE, H.; YANG, D.; CHEN, X.; LUO, Z.; LIU, D.; ZHU, Z. Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Hypertens Res*, v. 33, n. 5, p. 446-453, mai 2010.
77. MACKAY, C. E.; KNOCK, G. A. Control of vascular smooth muscle function by Src-family Kinases and reactive oxygen species in health and disease. *J Physiol.*, p. 1-14, nov 2014.

78. MACMICKING, J.D.; NATHAN, C.; HOM, G.; CHARTRAIN, N.; FLETCHER, D.S.; TRUMBAUER, M.; STEVENS, K.; XIE, Q.W.; SOKOL, K.; HUTCHINSON, N.; CHEN, H.; MUDGETT, J.S. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell**, v. 81, n. 4, p. 641-50, may 1995.
79. MALINOWSKI, M.; DEJA, M. A.; GOŁBA, K. S.; ROLEDER, T.; BIERNAT, J.; WOŚ, S. Perivascular tissue of internal thoracic artery releases potent nitric oxide and prostacyclin-independent anticontractile factor. **Eur J Cardiothorac Surg.**, n. 33, v. 2, p. 225-31, feb 2008.
80. MARCHESI, C.; EBRAHIMIAN, T.; ANGULO, O.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. **Hypertension.**, n. 54, v. 6, p. 1384, 92, dec 2009.
81. McARDLE, W, KATCH F, KATCH V. **Fisiologia do exercício; energia, nutrição e desempenho humano**. 4 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.
82. MCNEILL, E.; CRABTREE, M.J.; SAHGAL, N.; PATEL, J.; CHUAIPHICHAJ, S.; IQBAL, A.J.; HALE, A.B.; GREAVES, D.R.; CHANNON, K.M. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation. **Free Radic Biol Med**, [s.v], [s.n], p.1-11., nov 2014.
83. MEIJER, R.I.; SERNE, E.H.; SMULDERS, Y.M.; VAN HINSBERGH, V.W.; YUDKIN, J.S.; ERINGA, E.C. Perivascular adipose tissue and its role in type 2 diabetes and cardiovascular disease. **Curr Diab Rep.**, n. 11, v. 3, p. 211-7, jun 2011.
84. MIYAZAKI, S.; IZAWA, T.; OGASAWARA, J. E.; SAKURAI, T.; NOMURA, S.; KIZAKI, T.; OHNO, H.; KOMABAYASHI, T. Effect of exercise training on adipocyte-size-dependent expression of leptin and adiponectin. **Life Sci.**, n. 86, v. 17-18, p. 691-8, apr 2010.
85. MOHAMMED, M. M. J.; MYERS, D. S.; SOFOLA, O. A.; HAINSWORTH, R.; DRINKHIL, M. J. Vasodilator effects of leptin on canine isolated mesenteric arteries and veins. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 771-774, ago 2007.

86. MONASSIER, L.; LAPLANTE, M. A.; AYADI, T.; DOLY, S.; MAROTEAUX, L. Contribution of gene-modified mice and rats to our understanding of the cardiovascular pharmacology of serotonin. **Pharmacol Ther.**, n. 128, v. 3, p. 559-67, dec 2010.
87. MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide and the Vascular Endothelium. In: MONCADA, S.; HIGGS, E.A (Organizadores). **The vascular endothelium I**. Edição 1, Nova York: SPRINGER VERLAG NY, 2006, p. 213-54.
88. MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and phamacology. **Pharmacol Rev.**, n. 43, v. 2, p. 109-42, jun 1991.
89. MONTAGUE, C. T.; PRINS, J. B.; SANDERS, L.; DIGBY, J. E.; O'RAHILLY, S. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. **Diabetes**, n. 46, v. 3, p. 342-7, mar 1997.
90. MONTEIRO, P. F.; MORGATI, R. P.; DELBIN, M. A.; CALIXTO, M. C.; LOPES-PIRES, M. E.; MARCONDES, S.; ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Platelet hyperaggregability in high-fat fed rats: A role for intraplatelet reactive-oxygen species production. **Cardiovasc Diabetol**, v. 11, n. 5, [s.p], jan 2012.
91. MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am J Physiol.**, v. 266, n. 6, p. 829-39, jun 1994.
92. MURAD, F. Nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate signaling in the eye. **Can J Ophthalmol.**, n. 43, v. 3, p. 291-4, jun 2008.
93. NAKAGAWA, K.; HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; OSHIMA, T.; Matsuura, H.; CHAYAMA, K. Leptin causes vasodilation in humans. **Hypertens Res**, v. 25, n. 2, p. 161-165, mar 2002.
94. NAPOLI, C.; DE NIGRIS, F.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; PIGNALOSA, O.; SICA, V.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide** v. 15, n. 4, p. 265-79, dec 2006.
95. NAPOLI, C.; IGNARRO, L, J.; Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Arch Pharm Res.**, n. 32, v. 8, p. 1103-08, aug 2009.
96. NILSSON, T.; LONGMORE, J.; SHAW, D.; PANTEV, E.; BARD, J. A.; BRANCHEK, T.; EDVINSSON, L. Characterization of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. **Eur J Pharmacol.**, n. 372, v. 1, p. 49-56, may 1999.

97. NUNES, K. P.; RIGSBY, C. S.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase and vascular diseases: what is the link? **Cell Mol Life Sci.**, v. 22, n. 67, p. 3823, 36, nov 2010.
98. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Obesity and overweight**. Fact sheet, n.311. Disponível em (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>), 2008.
99. OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol.**, n. 11, v. 2, p. 85-97, feb 2011.
100. PAOLI, A.; PACELLI, Q.F.; MORO, T.; MARCOLIN, G.; NERI, M.; BATTAGLIA, G.; SERGI, G.; BOLZETTA, F.; BIANCO, A. Effects of high-intensity circuit training, low-intensity circuit training and endurance training on blood pressure and lipoproteins in middle-aged overweight men. **Lipids Health Dis**, n. 131, v. 12, [s.p.], sep 2013.
101. PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; ROPELLE, E. R. New mechanisms by which physical exercise improves insulin resistance in the skeletal muscle. **Arq Bras Endocrinol Metabol.**, n. 53, v. 4, p. 399-408, jun 2009.
102. PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; CARVALHO-FILHO, M. A.; MORAES, J. C.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/AKT in diet-induced obese Wistar rats. **J Physiol.**, n. 586, v. 2, p. 659-71, jan 2008.
103. PAYNE, G.A.; BORBOUSE, L.; KUMAR, S.; NEEB, Z.; ALLOOSH, M.; STUREK, M.; TUNE, J.D. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase c-beta pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, n. 30, v. 9, p. 1711-7, sep 2010.
104. PELLIZZON, M.; BUISSON, A.; ORDIZ, F. JR.; SANTA ANA, L.; JEN, K. L. Effects of dietary fatty acids and exercise on body-weight regulation and metabolism in rats. **Obes Res.**, n. 10, v. 9, p. 947-55, sep 2002.
105. PERREAULT, M.; MARETTE, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nat Med.**, n. 7, v. 10, p. 1138-43, oct 2001.
106. PORRECA, E.; DI FEBBO, C.; MORETTA, V.; ANGELINI, A.; GUGLIELMI, M. D.; DINISIO, M.; CUCCURULLO, F. Circulating leptin is associated with oxidized LDL in postmenopausal women. **Atherosclerosis**, n. 175, v. 1, p. 139-43, jul 2004.

107. RAHMOUNI, K.; HAYNES, W. G. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. **Curr Diab Rep.**, n. 5, v. 4, p. 260-6, aug 2005.
108. RAJSHEKER, S.; MANKA, D.; BLOMKALNS, A. L.; CHATTERJEE, T. K.; STOLL, L. L.; WEINTRAUB, N. L. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. **Curr Opin Pharmacol**, v. 10, n. 2, p. 191-196, abr 2010.
109. REIFENBERGER, M. S.; TURK, J. R.; NEWCOMER, S. C.; BOOTH, F. W.; LAUGHLIN, M. H. Perivascular Fat Alters Reactivity of Coronary Artery: Effects of Diet and Exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 12, p. 2125-2134, dez 2007.
110. RODRIGUES, B.; FIGUEROA, D. M.; MOSTARDA, C.; HEEREN, M. V.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovas Diabetol**, v. 6, n.38, [s.p], dez 2007.
111. RODRIGUES, B.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. CORRELATION BETWEEN SPEED AND OXYGEN CONSUMPTION (VO₂) IN RATS SUBMITTED TO MAXIMUM EXERCISE TEST. **The FIEP Bulletin**, v. 76, p. 231-233, 2006.
112. RUSCHKE, K.; FISHBEIN, L.; DIETRICH, A.; KLÖTING, N.; TÖNJES, A.; OBERBACH, A.; FASSHAUER, M.; JENKNER, J.; SCHÖN, M.R.; STUMVOLL, M.; BLÜHER, M.; MANTZOROS, C.S. Gene expression of PPAR γ and PGC-1 α in human omental and subcutaneous adipose tissues is related to insulin resistance markers and mediates beneficial effects of physical training. **Eur J Endocrinol**, n. 162, v. 3, p. 515-23, mar 2010.
113. RUSH, J.W.; DENNISS, S.G.; GRAHAM, D.A. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. **Can J Appl Physiol**, n. 30, v. 4, p. 442-74, 2005.
114. SAHIN, A. S.; BARISKANER, H. The mechanisms of vasorelaxant effect of leptin on isolated rabbit aorta. **Fund & Clin Pharmacol**, v. 21, n. 6, p. 595-600, dez 2007.
115. SAKURAI, T.; IZAWA, T.; KIZAKI, T.; OGASAWARA, J.E.; SHIRATO, K.; IMAIZUMI, K.; TAKAHASHI, K.; ISHIDA, H.; OHNO, H. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat White adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, n. 379, v. 2, p. 605-9, feb 2009.

- 116.SAKURAI, T.; OGASAWARA, J.; KIZAKI, T.; SATO, S.; ISHIBASHI, Y.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, O.; OH-ISHI, S.; NAGASAWA, J.; TAKAHASHI, K.; ISHIDA, H.; IZAWA, T.; OHNO, H. The effects of exercise training on obesity-induced dysregulated expression of adipokines in white adipose tissue. **Int J Endocrinol**, n. 801743, p. 1-29, dec 2013.
- 117.SAKURAI, T.; TAKEI, M.; OGASAWARA, J.; WATANABE, N.; SANPEI, M.; YOSHIDA, M.; NAKAE, D.; SAKURAI, T.; NAKANO, N.; KIZAKI, T.; OHNO, H.; IZAWA, T. Exercise training enhances tumor necrosis factor-alpha-induced expressions of anti-apoptotic genes without alterations in caspase-3 activity in rat epididymal adipocytes. **Jpn J Physiol.**, n. 55, v. 3, p. 181-9, jun 2005.
- 118.SALISBURY, D.; BRONAS, U. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Impact on Endothelial_Dysfunction. **Nurs Res.**, v. 64, n. 1, p. 53-66, jan/fev 2015.
- 119.SATOH, K.; FUKUMOTO, Y.; SHIMOKAWA, H. Rho-kinase: importante new therapeutic target in cardiovascular diseases. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 2, p. 301, p. 287-96, aug 2011.
- 120.SCHRAUWEN, P.; WESTERTERP, K. R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **Br J Nutr.**, n. 84, v. 4, p. 417-27, oct 2000.
- 121.SERAFIM, R.A.; PRIMI, M.C.; TROSSINI, G.H.; FERREIRA, E.I. Nitric oxide: state of the art in drug design. **Curr Med Chem.**, n. 19, v. 03, p 386-405, 2012.
- 122.SHYY, J. Y.; CHIEN, S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. **Circ Res.**, n. 91, v. 9, p. 769-75, nov 2002.
- 123.SOLTIS, E. E.; CASSIS, L. A. Influence of Perivascular Adipose Tissue on Rat Aortic Smooth Muscle Responsiveness. **Clin Exp Hypertens**, v. 13, n. 2, p. 277-296, jan 1991.
- 124.SOMANI, S. M.; HUSAIN, K.; DIAS-PHILLIPS, L.; LANZOTTI, D. J.; KARETI, K, R.; TRAMMELL, G. L. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. **Alcohol**, n. 13, v. 6, p. 603-10, nov-dec 1996.
- 125.STUNES, A.K.; RESELAND, J.E.; HAUSO, O.; KIDD, M.; TØMMERÅS, K.; WALDUM, H.L.; SYVERSEN, U.; GUSTAFSSON, B.I. Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation.**Diabetes Obes Metab.**, n. 13, v. 6, p. 551-8, jun 2011.

- 126.SZASZ, T.; WEBB, R. C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clinical Science*, v. 122, n. 1, p.1-12, jan 2012.
- 127.TALAYERO, B.G.; SACKS, F.M. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep*, n. 13, v. 6, p. 544-52, dec 2011.
- 128.THOMPSON, B. R.; LOBO, S.; BERNLOHR, D. A. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol Cell Endocrinol.*, n. 318, v. 1-2, p. 24-33, apr 2010.
- 129.TIRYAKI-SONMEZ, G.; OZEN, S.; BUGDAYCI, G.; KARLI, U.; OZEN, G.; COGALGIL, S.; SCHOENFELD, B.; SOZBIR, K.; AYDIN, K. Effect of exercise on appetite-regulating hormones in overweight women. *Biol Sport*, n. 20, v. 2, PL 75-80, jun 2013.
- 130.TRAUB, O.; BERK, B. C. Laminar Shear Stress: Mechanisms by Which Endothelial Cells Transduce an Atheroprotective Force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 18, n. 5, p. 677-685, mai 1998.
- 131.TSCHÖP, M.; HEIMAN, M. L. Rodent obesity models: An overview. *Exp Clin Endocrinol & Diabetes*, v. 109, n. 6, p. 307- 319, 2001.
- 132.TSENG, M.L.; HO, C.C.; CHEN, S.C.; HUANG, Y.C.; LAI, C.H.; LIAW, Y.P. A simple method for increasing levels of high-density lipoprotein cholesterol: a pilot study of combination aerobic-and resistance-exercise training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, n. 23, v. 3, p. 271-81, jun 2013.
- 133.TURNER, N.; COONEY, G.J.; KRAEGEN, E.W.; BRUCE, C.R. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol.*, n. 220, v. 2, p. 61-79, jan 2014.
- 134.UCHIDA-KITAJIMA, S.; YAMAUCHI, T.; TAKASHINA, Y.; OKADA-IWABU, M.; IWABU, M.; UEKI, K.; KADOWAKI, T. 5-hydroxytryptamine 2A receptor signaling cascade modulates adiponectin and plasminogen activator inhibitor 1 expression in adipose tissue.*FEBS Lett.*, n. 582, v. 20, p. 3037-44, sep 2008.
- 135.ULLMER, C.; SCHMUCK, K.; KALKMAN, H.O.; LÜBBERT, H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett.*, n. 370, v. 3, p. 215-21, aug 1995.

136. VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 143, p. 299-330, 1963.
137. VANHOUTTE, P. M.; MOMBOULI, J. V. Vascular endothelium: vasoactive mediators. **Prog Cardiovasc Dis.**, n. 39, v. 3, p. 229-38, nov-dec 1996.
138. VASCONCELOS, L. A. B. A.; CARVALHO, H. F. Célula muscular lisa. In: Células: uma abordagem multidisciplinar. Org: Carvalho HF e Collares-Buzato CB. São Paulo:
139. VERLOHREN, S.; DUBROVSKA, G.; TSANG, S.Y.; ESSIN, K.; LUFT, F.C.; HUANG, Y.; GOLLASCH, M. Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. **Hypertension**, n. 44, v. 3, p. 271-6, sep 2004.
140. VIEIRA, V.J.; VALENTINE, R.J.; WILUND, K.R.; ANTAO, N.; BAYNARD, T.; WOODS, J.A. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, n. 296, v. 5, p. 1164-71, may 2009.
141. WANG, Y.C.; LU, J.M.; JIN, H.Z.; MA, A.N.; ZHANG, J.Y.; GONG, N.; XIAO, Q.; ZHU, B.; LV, Y.F.; YU, N.; ZHANG, W.D.; WANG, Y.X. Beneficial effects of natural Jeju groundwaters on lipid metabolism in high-fat diet-induced hyperlipidemic rats. **Nutr Res Pract**, n. 8, v. 2, p. 165-71, apr 2014.
142. WANG, Z. V.; SCHEIDER, P. E. Adiponectin, Cardiovascular Function, and Hypertension. **Hypertension**, v. 51, n. 1, p. 8-14, jan 2008.
143. WATTS, S. W.; MORRISON, S. F.; DAVIS, R. P.; BARMAN, S. M. Serotonin and blood pressure regulation. **Pharmacol. Rev.**, n. 64, v. 2, p. 359-388, apr 2012.
144. WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**, n. 27, v. 1, p. 201-6, dec 2003.
145. WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am J Clin Nutr**, v. 67, n. 3, p. 505-512, mar. 1998.
146. WESTON, A.H.; EGNER, I.; DONG, Y.; PORTER, E. L.; HEAGERTY, A. M.; EDWARDS, G. Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocytes BK_{Ca} channels and adiponectin. **Br J Pharmacol**, v. 7, n. 169, p. 1500-9, aug 2013.

147. WIRTH, A. Rho-kinase and hypertension. **Biochim Biophys Acta.**, v. 12, n. 1802, p. 1276-84, dec 2010.
148. WITHERS, S. B.; SIMPSON, L.; FATTAH, S.; WERNER, M.E.; HEAGERTY, A. M. cGMP-dependent protein kinase (PKG) mediates the anticontractile capacity of perivascular adipose tissue. **Cardiovasc Res**, v. 1, n. 101, p. 130-7, oct 2013.
149. XU, X.; ZHAO, W.; LAO, S.; WILSON, B. S.; ERIKSON, J. M.; ZHANG, J. Q. Effects of exercise and L-arginine on ventricular remodeling and oxidative stress. **Med Sci Sports Exerc.**, n. 42, v. 2, p. 346-54, feb 2010
150. YAMASHITA, N.; HOSHIDA, S.; OTSU, K.; ASAHI, M.; KUZUYA, T.; HORI, M. Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. **J Exp Med.**, n. 189, v. 11, p. 1699-706, jun 1999.
151. YASARI, S.; WANG, D.; PRUD'HOMME, D.; JANKOWSKI, M.; GUTKOWSKA, J.; LAVOIE, J.M. Exercise training decreases plasma leptin levels and the expression of hepatic leptin receptor-a, -b, and -e in rats. **Mol Cell Biochem.**, n 324, v. 1-2, p. 13-20, apr 2009.
152. YOO, H.J.; CHOI, K.M. Adipokines as a novel link between obesity and atherosclerosis. **World J Diabetes**, n. 5, v. 3, p. 357-63, jun 2014.
153. YUDKIN, J. S.; ERING, E.; STEHOUWER, C. D. A. "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. **Lancet**, v. 365, n. 9473, p. 1817-1820, mai 2000.
154. ZACHWIEJA, J. J.; HENDRY, S. L.; SMITH, S. R.; HARRIS, R.B. Voluntary wheel running decreases adipose tissue mass and expression of leptin mRNA in Osborne-Mendel rats. **Diabetes**, n. 46, v. 7, p. 1159-66, jul 1997.
155. ZANESCO, A ; ANTUNES, E . Effects of exercise training on the cardiovascular system: Pharmacological approaches. **Pharmacology & Therapeutics (Oxford)**, n. 114, v. 3, p. 307-317, 2007.
156. ZANESCO, A.; ANTUNES, E. Células endoteliais. In: Carvalho HF, Buzato CBC, editores. **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole; 2005.
157. ZANESCO, A.; DE MORAES, C. Sistemas Cardiovascular. In: Zanesco, A; Puga, G., editores. **Doenças Cardiometabólicas e Exercícios Físico**. Rio de Janeiro: Revinter; 2013. p. 01-08.

10-ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA - IB - UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 012/2013

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Educação Física
Protocolo nº: 2846	Data de Registro CEUA: 07.5.2013
Projeto de Pesquisa: "Papel do tecido adiposo perivascular em aorta de ratos treinados e tratados com dieta hiperlipídica".	
Subprojetos vinculados: ==,==	

Pesquisador Responsável: Angelina Zanesco

Orientando(a): Hygor Nunes Araújo

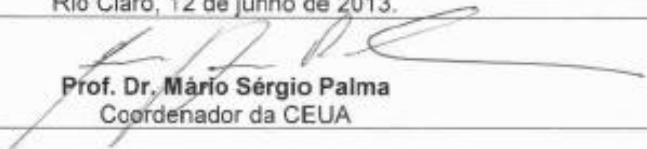
Colaborador(es): Maria Andréia Delbin, Edson Antuens e Carmem Peres Valgas da Silva.

Objetivo Acadêmico:	<input type="checkbox"/> TCC <input checked="" type="checkbox"/> Mestrado <input type="checkbox"/> Doutorado <input type="checkbox"/> Outros – (Especificar)
---------------------	---

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua **16ª reunião ordinária**, realizada em **12/6/2013**.

<input checked="" type="checkbox"/>	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
<input type="checkbox"/>	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
<input type="checkbox"/>	Não Aprovou.
<input type="checkbox"/>	Retirou , devido à permanência das pendências.

Rio Claro, 12 de junho de 2013.


Prof. Dr. Mário Sérgio Palma
 Coordenador da CEUA