

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCG UFSCar-UNESP

JORGE CAMARGO OISHI

**CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES NO PERFIL
INFLAMATÓRIO, FUNÇÃO ENDOTELIAL E CARDIOVASCULAR NA
OBESIDADE EXPERIMENTAL**

São Carlos

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – PIPGCG UFSCar-UNESP

JORGE CAMARGO OISHI

**CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES NO PERFIL
INFLAMATÓRIO, FUNÇÃO ENDOTELIAL E CARDIOVASCULAR NA
OBESIDADE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Associação Ampla UFSCar/ UNESP, para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Garcia de Oliveira Duarte

Co-Orientador: Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O39c Oishi, Jorge Camargo
Cinética do desenvolvimento de alterações no
perfil inflamatório, função endotelial e
cardiovascular na obesidade experimental / Jorge
Camargo Oishi. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
79 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Tecido adiposo. 2. Inflamação crônica. 3. Dieta
hiperlipídica. 4. Disfunção endotelial. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO




UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Jorge Camargo Oishi, realizada em 24/08/2016:



Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte
UFSCar



Profa. Dra. Audrey Borghi e Silva
UFSCar



Profa. Dra. Fernanda Oliveira Duarte
USP



Prof. Dr. Fernando Fabrizzi
UNICEP



Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Maria
Ignês Camargo Oishi e Jorge Oishi, pois sem eles
eu não chegaria até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte, pela orientação, pelo conhecimento transmitido, pela amizade e companheirismo, e por me aceitar como seu aluno.

Ao meu co-orientador Gerson Jhonatan Rodrigues, pelos ensinamentos, e por tornar a realização deste trabalho possível.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

A todos os meus amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício, Toninho, Isabel Cristina, Anderson, Cynthia. Em especial ao nosso técnico José Alves pela ajuda nos experimentos.

A todos os amigos do Departamento de Educação Física, onde tive experiências acadêmicas muito importantes.

Aos amigos do Laboratório de neuroendócrinologia, Vitor, Karina, Bruna, e ao seu Sergio pelos bate-papos altamente produtivos durante a pausa do café.

A Prof. Dra. Ana Lucia Kalinin e seus alunos Rafael e Raquel pela ajuda indispensável neste trabalho.

A todos que me ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

A minha namorada e companheira de todas as horas Rafaela Roberta Lourenço, pelo apoio incondicional, paciência e carinho e amor com que me atura.

RESUMO

A obesidade atualmente é um dos grandes problemas de saúde nos países desenvolvidos e em desenvolvimento e esta associada com o desenvolvimento de várias doenças metabólicas e cardiovasculares, que levam ao aumento nas taxas de morbidade e mortalidade. A obesidade é marcada pela presença de inflamação crônica de baixo grau, que altera a produção e liberação de citocinas, que pode levar ao desenvolvimento de resistência à insulina e disfunção endotelial, a qual é precursora de vários problemas cardíacos.

Desta maneira, o objetivo deste estudo foi traçar o time-course no surgimento da inflamação, disfunção endotelial, resistência à insulina, pressão arterial e força de contração ventricular durante a evolução da obesidade em ratos wistar alimentados com dieta hiperlipídica durante 24 semanas. Para identificar essa evolução, os animais foram avaliados a cada 6 semanas, mensurando as citocinas IL-6, TNF- α , PCR e adiponectina, resistência à insulina, função endotelial, pressão arterial e a força de contração em tiras isoladas do ventrículo esquerdo. Nossos resultados indicam que com apenas 6 semanas de dieta hiperlipídica ocorre aumento da gordura visceral total, com aumento das citocinas inflamatórias circulantes, diminuição na função endotelial e aumento da resistência à insulina. Com 12 semanas podemos observar aumento na pressão sanguínea com aumento na peroxidação lipídica na aorta, e finalmente com 24 semanas alterações morfológicas na aorta e diminuição na força de contração cardíaca. Desta maneira, este trabalho avaliou a cinética do desenvolvimento das alterações no perfil inflamatório, função endotelial e cardiovascular durante o desenvolvimento da obesidade.

Palavras - chave: Tecido adiposo, Inflamação Crônica, dieta hiperlipídica, disfunção endotelial

ABSTRACT

Obesity is a metabolic disorder and its prevalence is increasing worldwide, which in turn significantly increase the morbidity and mortality rates associated. Obesity is associated with several diseases risk factors, the expand of adipose tissue lead a chronic inflammatory state, insulin resistance, endothelial dysfunction and hypertension and cardiovascular diseases. The hallmark of obesity is the low grade inflammation, with increase of production and secretion of several proinflammatory cytokines that lead to insulin resistance and endothelial dysfunction, which is a precursor to cardiovascular disease and cardiovascular outcome. Therefore, the aim of this study was to investigate the evolution of comorbidities together with obesity evolution. In this way, we fed Wistar male rats with a palatable high fat diet during twenty-four weeks and every 6 weeks was evaluate: The inflammatory state by measuring cytokines pro-inflammatory (interleukin -6 tumor necrosis factor α , reactive C protein) and anti-inflammatory adiponectin; the endothelial function; the Nitric Oxide levels, blood pressure and cardiac contractile. Our results indicated that six weeks of high fat feeding rats increase visceral fat and triggers inflammatory state, insulin resistance and endothelial dysfunction. At 12 weeks of high fat diet an increase in blood pressure and lipid peroxidation in aorta was observed and at 24 weeks an impaired on cardiac contractile was observed. To our knowledge, this is the first study showing the evolution of metabolic disorders in high-fat diet model.

Key Words: Endothelial dysfunction, Hypertension, Nitric Oxide, Obesity, High-fat-diet, Time course.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1. Representação do tecido adiposo como órgão endócrino.....	2
FIGURA 2. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina.....	5
FIGURA 3. Contribuição dos adipócitos e macrófagos na inflamação relacionada a obesidade. Adipócitos secretam fatores que atraem monócitos que se diferenciam em macrófagos. Adipócitos e macrófagos interagem e aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, promovendo inflamação sistêmica.....	8
FIGURA 4. Ilustração da estimulação da NO sintase (eNOS) por acetilcolina e <i>shear stress</i> ocasiona aumento na produção e liberação de NO pelas células endoteliais, o qual se difunde para as células musculares lisas ocasionado diminuição na concentração de cálcio intracelular, levando ao relaxamento muscular liso.....	10
FIGURA 5. Relação entre a obesidade e hipertensão e mecanismos pelos quais a obesidade pode causar a hipertensão.....	11
FIGURA 6. Protocolo experimental.....	16
FIGURA 7. Esquema ilustrativo de medição de Pressão Sanguínea em ratos pelo método de pletismografia de cauda.....	18
FIGURA 8. Esquema ilustrativo da realização do protocolo de estudo da reatividade vascular em artérias isoladas.....	20
FIGURA 9. Esquema ilustrativo da realização do protocolo de estudo da força de contração isométrica em tiras musculares isoladas.....	24
FIGURA 10. Consumo alimentar dos grupos CT e HFD durante as 24 semanas de protocolo experimental.....	26

FIGURA 11. Evolução da massa corporal nos grupos CT e HFD.....	27
FIGURA 12. Evolução do tecido visceral total (epididimal, visceral e retroperitoneal-GVT).....	28
FIGURA 13. Triglicerídeos séricos durante as 24 semanas.....	29
FIGURA 14. Teste de tolerância a insulinas (ITT) no grupo CT em 0, 6, 12, 18 e 24 semanas.....	30
FIGURA 15. Teste de tolerância a insulinas (ITT) no grupo HFD em 0, 6, 12, 18 e 24 semanas.....	30
FIGURA 16. Área sob a curva do teste de tolerância a insulina (AUC -ITT) nos grupos CT e HFD.....	30
FIGURA 17. Concentração sérica de IL-6 no grupo controle (CT) e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas	32
FIGURA 18. Concentração sérica de TNF- α nos grupos controle (CT) e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas.....	32
FIGURA 19. Concentração sérica de PCR no grupo controle (CT) e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas.....	33
FIGURA 20. Concentração sérica de Adiponectina nos grupos controle (CT) e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas.....	34
FIGURA 21. Curva concentração efeito para ACH dependente de endotélio induzido em anéis aórticos do grupo controle (CT) realizados no início do período experimental (0) e em 6, 12, 18 e 24 semanas.....	36
FIGURA 22. Curva concentração efeito para ACH dependente de endotélio induzido em anéis aórticos do grupo alimentado com dieta hiperlipídica (HFD)	

realizados no início do período experimental (0) e em 6, 12, 18 e 24 semanas.....36

FIGURA 23. Comparação entre a potência (pD₂) de relaxamento dependente de endotélio induzido por acetilcolina (ACH) em anéis aórticos do grupo CT e HFD realizados no início do período experimental (0) e em 6, 12, 18 e 24 semanas.....37

FIGURA 24. Concentração sérica de óxido nítrico (NO) nos grupos CT e HFD.....38

FIGURA 25. Peroxidação lipídica em anéis aórticos dos grupos CT e HFD.39

FIGURA 26. Evolução na Pressão sanguínea dos grupos CT e HFD durante as 24 semanas de protocolo experimental.....40

FIGURA 27. Correlação entre (A) pressão arterial e gordura visceral total (GVT), e (B) e entre a pressão arterial e pD₂ durante todo o período experimental.....40

FIGURA 28. Histologia da artéria aorta, nos grupos CT e HFD em 0, 6, 12, 18 e 24 semanas.....42

FIGURA 29. Curvas concentração efeito para o aumento de cálcio extracelular em tiras musculares isoladas do ventrículo esquerdo dos animais do grupo CT e HFO nos tempos 0 (A), em 6 semanas (B), 12 semanas (C), 18 semanas (D) e 24 semanas (E).....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional da dieta padrão e hiperlipídica.....	17
Tabela 2. pD2 e Emax dos grupos CT e HFD durante as 24 semanas de protocolo.....	35
Tabela 3. Espessura em μm , Diâmetro interno (DI) em μm , e da razão espessura do vaso/DI.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH	Acetilcolina
AVC	Acidente vascular cerebral
CAD	Doenças Cardiovasculares
CT	Grupo controle
DAC	Doença arterial coronariana
GCs	Guanilato ciclase solúvel
EC₅₀	Concentração do agonista capaz de produzir metade da resposta máxima
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	NO sintase endotelial
E_{max}	Relaxamento máximo induzido
EPI	Tecido adiposo branco visceral epididimal
EPM	Erro padrão da media
GVT	Gordura visceral total
HFD	High Fat Diet
ITT	(<i>Insulin Tolerance test</i>) Teste de tolerância a insulina
IL-6	Interleucina-6
Kcal	Quilocalorias
Kcal/g	Quilocalorias por grama
mg/dl	Miligramas por decilitro
ml	Mililitro
ng/ml	Nanograma por mililitro
NO	Oxido Nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
PAS	Pressão Arterial sanguínea
PCR	Proteína C-Reativa
pD₂	Logaritmo negativo da EC ₅₀
pg/ml	Picograma por mililitro
RET	Tecido adiposo branco visceral retroperitoneal
TG	Triglicerídeos
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral- α
μM	Micrômetros
VIS	Tecido adiposo branco visceral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Tecido adiposo e Inflamação.....	2
1.2 Resistência à Ação da insulina e Diabetes.....	3
1.3 Obesidade e Sistema Vascular.....	8
1.4 Justificativa.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Animais.....	15
3.2 Grupos experimentais.....	15
3.3 Dieta Padrão.....	16
3.4 Dieta hiperlipídica.....	16
3.5 Controle de peso e consumo alimentar.....	17
3.6 Teste de Tolerância à insulina (ITT).....	17
3.7 Coleta das Amostras.....	17
3.8 Níveis séricos de triglicérides.....	18
3.9 Determinação da Pressão Arterial.....	18
3.10 Estudo da Reatividade vascular em aortas isoladas.....	19
3.11 Análise histológica.....	20
3.12 Determinação Sérica de Adiponectina, IL-6, IL, TNF- α Proteína C Reativa.....	21
3.13 Determinação sérica de NO (Nitrito/Nitrato-NOx).....	22
3.14 Determinação dos Níveis de Hidroperóxido de Lipídios (FOX).....	23
3.15 Análise da contratilidade cardíaca.....	23
3.16 Análise estatística.....	25
4.RESULTADOS.....	26
4.1 Consumo Alimentar, Massa Corporal e Gordura Visceral Total (GVT).....	26
4.2 Concentração de triglicerídeos séricos.....	28
4.3 Tolerância a insulina.....	29
4.4 Níveis séricos de IL-6, TNF- α , Adiponectina e PCR.....	31
4.5 Reatividade vascular.....	34
4.6 Concentração sérica de Óxido Nítrico (NO) e peroxidação lipídica na Aorta.....	38
4.7 Mensuração da pressão arterial.....	39
4.8 Análise histológica da aorta.....	41
4.9 Contratilidade do músculo cardíaco.....	43
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	54
7. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a obesidade é um dos grandes problemas de saúde tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, assim como suas comorbidades associadas, aumentando os riscos de morbidade e mortalidade, reduzindo tanto a qualidade como a expectativa de vida (Allison et al., 2008, Beleigoli et al., 2012, Alam et al., 2012). Dentre as comorbidades associadas à obesidade, as doenças cardiovasculares são uma das maiores causas de mortalidade no mundo (WHO, 2016). O sobrepeso e obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo estocado, é intimamente associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dislipidemia, hipertensão, resistência à insulina que, agregado a um ambiente pró-inflamatório, leva a piora dos problemas cardiovasculares (Eikelis et al., 2012, Zalesin et al., 2011, Iantorno et al., 2014).

Neste contexto, a obesidade visceral, caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo ao redor das vísceras, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento destas patologias, que em conjunto compõem a chamada síndrome metabólica (Queiroz et al., 2009; Hall et al., 2015).

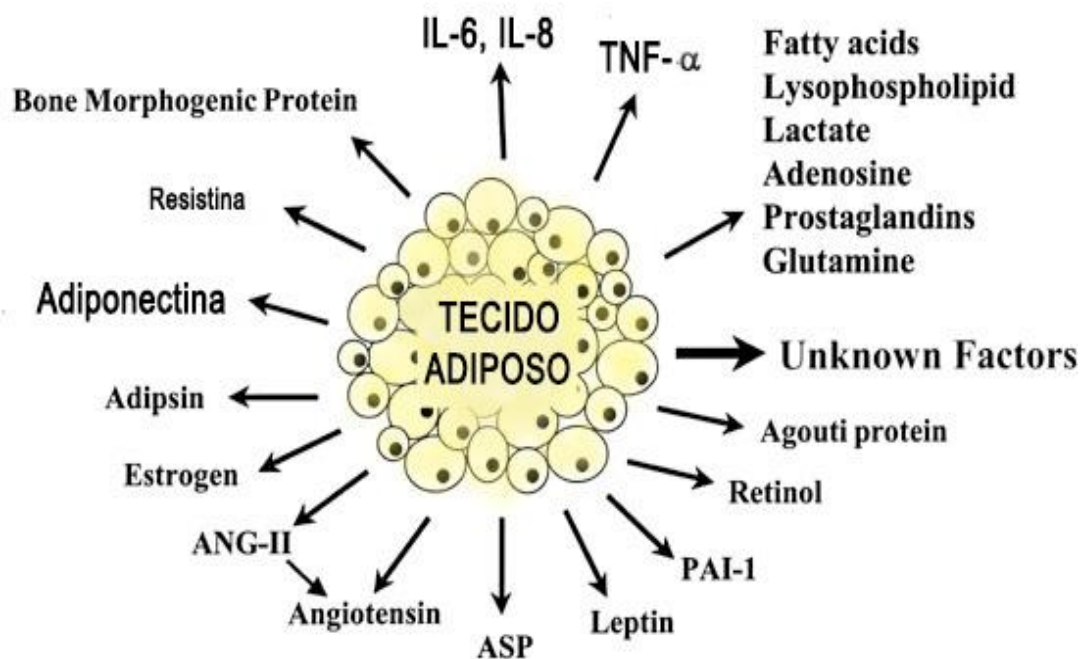
As evidências sugerem que o aumento das desordens metabólicas associadas ao aumento do tecido adiposo, característico na obesidade, desencadeia um quadro de inflamação crônica de baixo grau que desempenha papel chave nas disfunções metabólicas presentes na obesidade (Jung e Choi, 2014; Zalesin et al., 2011). Além disso, o tecido adiposo obeso produz grandes quantidades de marcadores inflamatórios e moléculas de adesão que contribuem para a instalação deste quadro inflamatório e desequilíbrio metabólico (Leggate et al., 2010; Jung e Choi, 2014).

Deste modo, o objetivo deste estudo foi traçar o *time-course* no surgimento da inflamação, disfunção endotelial, resistência à insulina, pressão arterial e força de contração ventricular durante a evolução da obesidade em ratos wistar alimentados com dieta hiperlipídica durante 24 semanas. Estudos que visem a caracterização fisiopatológica do desenvolvimento de doenças são essenciais para dar suporte a intervenção terapêutica, principalmente quando apresentam a evolução da doença

1.1. Tecido Adiposo e Inflamação

Na última década, houve um aumento no interesse em se conhecer os aspectos fisiológicos e patológicos do tecido adiposo. Ele foi considerado um órgão endócrino, uma vez que possui como atividade característica a capacidade de sintetizar e secretar substâncias denominadas adipocinas que atuam influenciando tanto a homeostase do peso corporal quanto a inflamação de forma local e ou sistêmica (Halberg et al., 2008; Jung e Choi, 2014). A Figura 1 apresenta a representação esquemática das substâncias produzidas pelo tecido adiposo.

Figura 1. Representação esquemática do tecido adiposo como órgão endócrino



Tecido adiposo é um órgão complexo e atua como órgão endócrino secretando várias proteínas. (Adaptado de Ravussin, 2002).

A função endócrina do tecido adiposo é determinada pelo seu padrão de secreção de adipocinas (Van Gaal et al, 2006; Bluher, 2009; Lehr et al, 2012). Desta forma, pode-se associar o risco do indivíduo em desenvolver as comorbidades

metabólicas e cardiovasculares relacionadas à obesidade a esse padrão (Lau et al., 2005; Adamczak et al., 2013; Zang et al., 1994, Das Un 2002).

Dentre as mais de 600 adipocinas produzidas e secretadas pelo tecido adiposo, existem aquelas que possuem papel de resposta ao processo inflamatório, incluindo as interleucinas (IL) 1, 6, 8, 10, fator de necrose tumoral alfa (TNF – α) e Proteína C reativa (PCR) (Lehr et al., 2010, Bluher, 2012; Smitka e Maresová, 2014).

Na obesidade, o aumento de adipócitos hipertrofiados reduz o fluxo sanguíneo, que acarreta hipóxia no tecido adiposo, induzindo a inflamação local e infiltração de macrófagos, que devido a essa obesidade alteram seu fenótipo anti-inflamatório M2 para o fenótipo pró-inflamatório M1 (Gutierrez et al, 2009), assim aumentam a produção de citocinas inflamatórias, contribuindo para a instalação da inflamação sistêmica do diabetes mellitus tipo II e da síndrome metabólica. (Queiroz et al., 2006; Bluher, 2010; Smitka e Maresová, 2014).

Estudos demonstram associação entre o índice de massa corporal (IMC) e o número de macrófagos no tecido adiposo visceral em humanos (Galic et al., 2010; Bastard et al., 2006). Weisberg et al., (2003) e XU et al., (2003) mostraram que o aumento do peso corporal, do tecido adiposo e do tamanho do adipócito de ratos estão fortemente associados ao aumento presença dos macrófagos M1 (predominantes na obesidade, secretam principalmente TNF- α e IL-6). Além disso, a gordura visceral está muito mais relacionada com essas comorbidades do que a gordura subcutânea, e que ainda existe forte relação com biomarcadores inflamatórios e o estresse oxidativo (Hager et al., 2008).

Esta ativação na rede de citocinas e adipocinas que acontece na obesidade provoca uma inflamação sistêmica e generalizada no tecido adiposo (Van Gaal et al., 2006; Kawasaki et al., 2012; Wisse, 2004) levando o organismo ao quadro de resistência à insulina, e a acelerar a dislipidemia aterogênica aumentando-se assim, a probabilidade desenvolver a síndrome metabólica e diabetes mellitus tipo II (Zalesin et al., 2011, Miller et al., 2005).

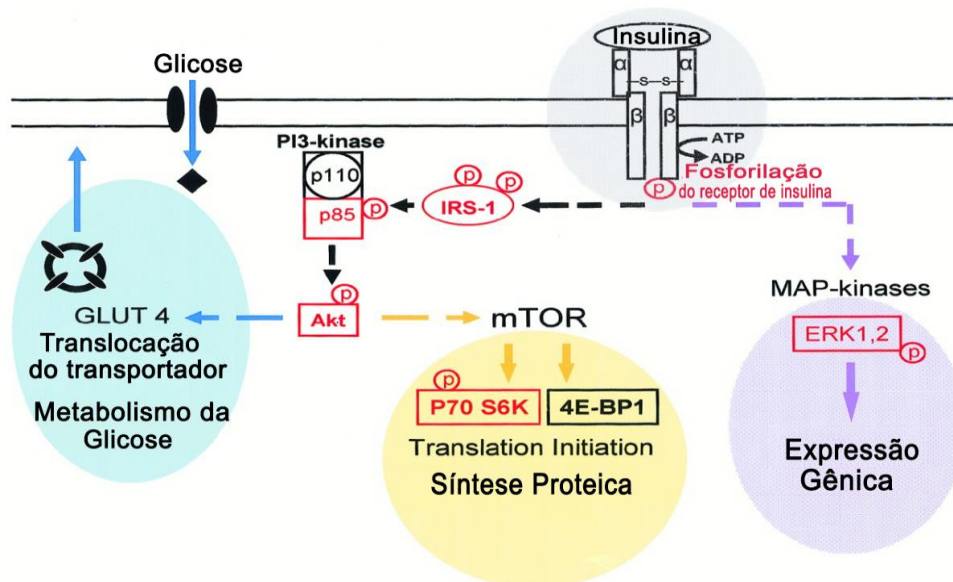
1.2. Resistência à Ação da Insulina e Diabetes

A inflamação crônica do tecido adiposo está associada à resistência a ação da insulina que é uma característica integrante da síndrome metabólica e a maior

preditora para o desenvolvimento do diabetes tipo II (Lillioja et al., 1993, Jung e Choi, 2014). Além disso, a resistência à insulina pode estar relacionada com a produção anormal de adipocinas e a ativação da rede de vias sinalização inflamatória incluindo a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), TNF- α e interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8)(Jung e Choi, 2014; Hotamisligil, 2006).

Um dos tecidos responsivos a insulina é o tecido adiposo que estimula o estoque de triglicerídeos via múltiplos mecanismos dentre os quais se destaca: o aumento de captação de glicose e de ácidos graxos derivados da circulação de lipoproteínas; a lipogênese nos adipócitos maduros; e a inibição da lipólise (Jung e Choi, 2014). A cascata de sinalização da insulina se inicia quando esta se liga ao seu receptor na membrana celular, ocasionando a fosforilação/ativação do substrato receptor de insulina (IRS), o que ativa duas vias principais de sinalização: a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)-AKT/proteína quinase B (PKB) e a via proteína quinase ativada por mitógeno-RAS (MAPK). A via PI3K-AKT/PKB é importante para a maioria das ações metabólicas de insulina. IRS-1 é fosforilado pelo receptor de insulina, ativando PI3K via domínio SH2, o que leva a formação do segundo mensageiro fosfatidilinositol-(3,4,5) trifosfato dependente de serina/treonina quinases, incluindo AKT/PKB, resultando na translocação do transportador de glicose 4 (GLUT 4) para a membrana plasmática e aumentando a captação de glicose pelo adipócito (Figura 2). Na obesidade, os ácidos graxos livres e as várias adipocinas liberadas pelo tecido adiposo obeso estão envolvidos na alteração da sinalização da insulina. É sugerido que os ácidos graxos e seus metabolitos, Ácil-coenzima-A, ceramidas e o diacilglicerol podem prejudicar a sinalização da insulina pela promoção de proteínas quinases, como a proteína quinase C (PKC), MAPK, c-Jun N-terminal quinase (JNK) e o fator nuclear inibidor quinase κ B. (Jung e Choi, 2014).

FIGURA 2. Representação esquemática das vias de sinalização da insulina.



O receptor de insulina é uma tirosina quinase que se autofosforila e catalisa a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS. Após a fosforilação essas proteínas se ligam a outras moléculas de sinalização através de seus domínios SH2, resultando na ativação de vias de sinalização intracelular como a via da PI 3-quinase, a cascata da MAPK e a ativação da via mTOR. Essas vias regulam o transporte de glicose, a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário (Anderson et al., 2005)

No contexto da resistência à insulina, a expressão de TNF- α aumenta, sendo sua expressão positivamente correlacionada com a resistência à insulina, em humanos (Hotamisligil et al., 1993). Seu mecanismo de ação, a partir da cascata de sinalização da insulina no tecido adiposo é autócrino, o que dificulta a interação da insulina com seu receptor devido a indução da fosforilação do IRS-1. Além disso, o TNF- α aumenta a atividade da lipase hormônio sensível (LHS) no tecido adiposo, ocasionando maior liberação de ácidos graxos livres na circulação e levando a resistência à insulina nos tecidos periféricos como o fígado e músculos esqueléticos (Smitka e Maresová, 2015).

Neste sentido, tanto o TNF- α quanto a IL-6 produzidas pelo tecido adiposo são relacionadas a modulação da resistência à insulina. A ausência de TNF- α ou a deleção de seu receptor resultam em melhora significativa da sensibilidade a insulina em camundongos obesos via dieta ou deficientes em leptina ob/ob (Rabe et al., 2008).

Segundo Nonogaki et al, (1995), o impacto metabólico produzido pelo aumento da expressão de IL-6 nos depósitos corporais de gordura, pode ser de crucial importância na patogenia da obesidade. O conteúdo plasmático aumentado de IL-6 estimula a síntese hepática de triacilglicerol, contribuindo para a hipertrigliceridemia associada à obesidade visceral, além de suprimir a expressão de adiponectina e receptores e sinalizadores de insulina (Leite et al, 2009). De fato, Volp et al., (2008) e Guimarães et al., (2007) demonstraram que indivíduos que apresentam doença cardiovascular mostraram níveis circulantes elevados de IL-6.

Em animais e indivíduos obesos a expressão e a secreção de TNF- α está aumentada, indicando sua correlação com a composição corporal, porcentagem de gordura corporal e hiperinsulinemia (Sakurai et al, 2009). A diminuição da massa corporal diminui os níveis de TNF- α , além de melhorar a insulinemia (Rabe et al., 2008). Além disso, o TNF- α tem papel direto no desenvolvimento de aterosclerose através da indução na expressão da molécula de adesão vascular celular -1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) tanto nas células endoteliais como musculares lisas (Smitka e Maresová, 2015) (Figura 3).

O TNF- α também induz a produção de IL-6 que desempenha papel importante no metabolismo de carboidratos e lipídios por aumentar a lipólise, com inibição da lipase lipoprotéica (LPL) e aumento da liberação de ácidos graxos livres e glicerol, e redução da expressão do substrato do receptor de insulina tipo 1 (IRS-1) e GLUT-4. Também desempenha uma gama de funções nos efeitos imunes celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual (Volp et al., 2008). Além disso, a IL-6 é uma citocina mediadora central da resposta inflamatória de fase aguda e a principal citocina pró-coagulante, induz a produção e aumento das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, proteína amilóide sérica A (SAA), e da proteína C reativa (PCR). (Mohamed-Ali et al., 1997; Smitka e Maresová, 2015; Fried et al., 1998; Gleeson et al., 2011).

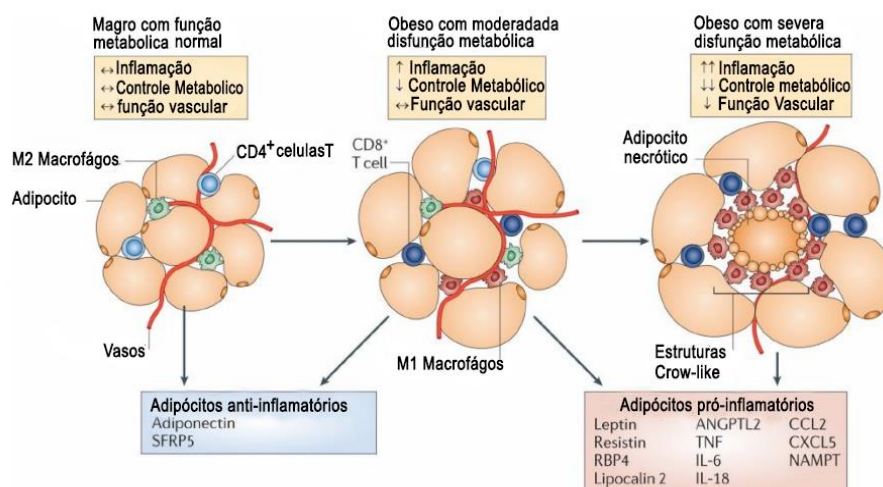
A Proteína C Reativa é uma proteína de fase aguda sintetizada principalmente pelo fígado e é regulada pelos níveis circulantes de TNF- α e IL-6 (Volp et al., 2008). A PCR é um sensível marcador de inflamação, e tem mostrado relação com o desenvolvimento da doença aterosclerótica em estudos experimentais e clínicos (Torzewski, et al., 1998; Cermak et al., 1993; Koenig et al., 1999; Volp et al., 2008), seus níveis aumentam aproximadamente 3 vezes na

presença de risco de doenças vasculares periféricas (Abdellaoui e AL-Khaffaf, 2007). Desta maneira a PCR é um eficaz preditor de doenças cardiovasculares (Koenig et al., 1999; Ridker et al., 2003) e) está linearmente correlacionado a síndrome metabólica. (Festa et al., 2000)

Por outro lado, a adiponectina, que possui propriedade anti-aterogênica, antidiabética e anti-inflamatória e são abundantemente expressas pelos adipócitos em situações fisiológicas normais (Fischer et al., 2005). Entretanto, os níveis circulantes de adiponectina estão inversamente correlacionados com a obesidade (Doyle et al., 2012). Os mecanismos para essa diminuição nos níveis de adiponectina ainda não estão muito bem elucidados, mas sabe-se que está relacionado com o aumento nos níveis de TNF- α , que pode inibir a secreção de adiponectina pelos adipócitos.

A adiponectina possui atividade anti-inflamatória, e sua redução está associada com uma elevação na inflamação crônica (Aprahamian e Sam, 2011). Além disso, ela pode possuir efeitos antiaterogênicos, de proteção na parede vascular agindo em vários estágios do processo aterogênico, reduz a concentração plasmática de ácidos graxos e triglicérides em modelos de obesidade com camundongos (Yamauchi et al., 2001), como também pode modular, suprimindo a secreção de TNF- α pelos macrófagos (Ouchi et al., 2000, Fantuzzi, 2005). Também inibe a expressão das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 via inibição do NF- κ B, além de suprimir a formação das células espumosas. Baixos níveis de adiponectina prejudicam o relaxamento endotélio dependente, sendo mais um fator que pode levar a hipertensão na obesidade (Van Gaal et al., 2006).

FIGURA 3. Contribuição dos adipócitos e macrófagos na inflamação relacionada a obesidade.



Adipócitos secretam fatores que atraem monócitos que se diferenciam em macrófagos. Adipócitos e macrófagos interagem e aumentam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, promovendo inflamação sistêmica. (Adaptado de Ouchi et al., 2011)

1.3. Obesidade e Sistema vascular

A obesidade tem efeito significativo sobre o sistema vascular, comprometendo a vasodilatação em resposta a estímulos fisiológicos ou farmacológicos, por exemplo, a demanda metabólica elevada ou infusão de agonista endotélio dependentes. Um dos mecanismos mais estudados sobre o relaxamento vascular dependente do endotélio tem sido as alterações na produção e liberação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio. (Stapleton et al., 2008).

Pacientes com síndrome metabólica exibem dilatação dependente do endotélio prejudicada em resposta a infusão de vasodilatadores, enquanto que os mecanismos de relaxamento independente de endotélio permanecem intactos. (Dolores Pietro et al., 2014). Estes resultados se repetem em estudos com animais, onde a indução da obesidade por dieta hiperlipídica (HFD) prejudica a resposta vasodilatadora de endotélio (Stapleton et al., 2008).

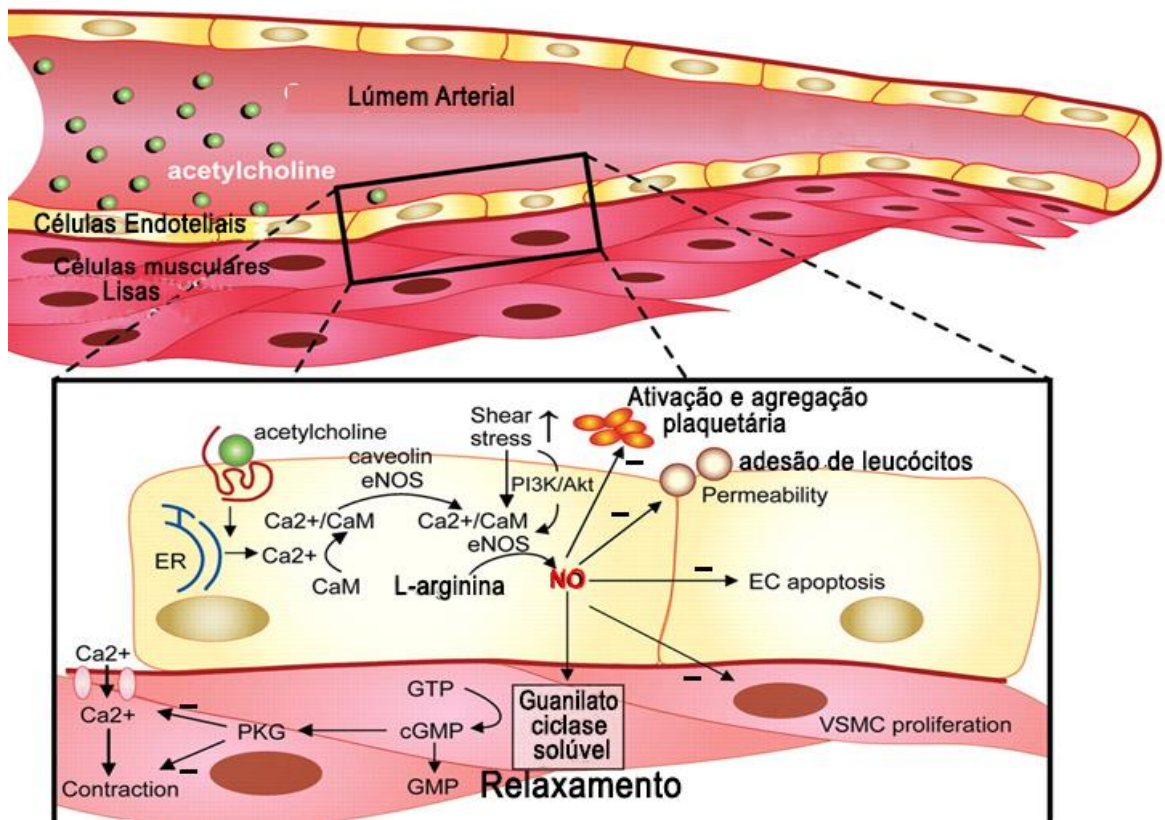
As funções alteradas do endotélio podem levar, em últimas instâncias, a doenças cardiovasculares, as quais estão correlacionadas com a obesidade (Avogaro e Kreutzenberg, 2005). O estudo de Framingham (Garrison et al., 1987; Reissigová e Tomecková, 2005) mostrou claramente a associação de doença arterial coronariana (DAC) com a obesidade, onde a taxa de frequência de DAC em

peças com IMC de 21 kg/m² está em 26,3 a cada 100 peças do sexo masculino, subindo para 42,2 a cada 100 quando o IMC está em 31 kg/m². Mais robusta torna-se a associação entre a obesidade e DAC quando se leva em consideração a distribuição de gordura. Vários estudos confirmaram que a adiposidade abdominal é um risco independente para DAC, tanto na população com idade avançada como em crianças e adolescentes (Avorago e Kreutzenberg, 2005). O endotélio vascular tem papel primordial na manutenção da homeostase cardiovascular, é uma monocamada que reveste todo o sistema vascular, e é mais do que ser uma interface física ente o lúmem e a parede do vaso. Ele secreta um grande número de mediadores que regulam a agregação plaquetária, coagulação, fibrose e também o tônus vascular. Estes mediadores podem, alternadamente, mediar tanto a vasoconstrição, como a dilatação.

O NO é o maior fator de relaxamento derivado do endotélio, o qual é produzida a partir de seu precursor L-arginina, a conversão da L-arginina em NO é catalisada pela família de enzimas NO sintases (NOS). Existem três isoformas identificadas, a NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e a forma induzível ou inflamatória (iNOS). Ativação de receptores muscarínicos pela acetilcolina nas células endoteliais ativam fosfolipase C (PLC) que catalisa a produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 ativa o receptor de IP3 no retículo sarcoplasmático e induz aumento de Ca²⁺ citosólico. O Ca²⁺ forma complexo calmodulina e ativa a a eNOS (Figura 3). A fosforilação da eNOS pela proteína quinase A (PKA) inativa a enzima (Avogaro e Kreutzenberg, 2005; Furchgot, 1983, Kang 2014).

O NO produzido pela célula endotelial se difunde rapidamente para as células musculares lisas adjacentes interagindo com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GCs) ativando-a. A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato cíclica (GTP) resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O GMPc por sua vez modula a proteína quinase G (PKG), ocasionando diminuição de cálcio intracelular, ocasionando o relaxamento vascular liso. (Furchgot, 1983; Vanhoutte, 1988; Kang 2014, Wobst et al., 2015), (FIGURA 4).

FIGURA 4. Ilustração mostrando a estimulação da NO sintase (eNOS) por acetilcolina e *shear stress*



O aumento na produção e liberação de NO pelas células endoteliais, que se difunde para as células musculares lisas ocasionado diminuição na concentração de cálcio intracelular, levando ao relaxamento muscular liso, adaptado de Joerg Herrmann et al., (2010).

A disfunção endotelial é uma condição patológica, caracterizada principalmente pelo desbalanço entre a liberação de substâncias vasodilatadoras, anti-mitogênicas e anti-trombogênicas e substâncias vasoconstritoras, pró-mitogênicas e trombóticas. Como mencionado anteriormente, o NO é a mais importante molécula vasodilatadora, a qual também possui papel inibidor em outros eventos importantes no desenvolvimento da aterosclerose, tais como a adesão e agregação, adesão e migração de leucócitos como também a proliferação de células musculares lisas. Desta maneira, a mensuração da reatividade vascular dependente de endotélio, do NO e de outras moléculas fornecem informações a respeito da função e integridade do endotélio, e particularmente a disfunção endotelial está associado a fatores de risco cardiovasculares (Bonetti et al 2003).

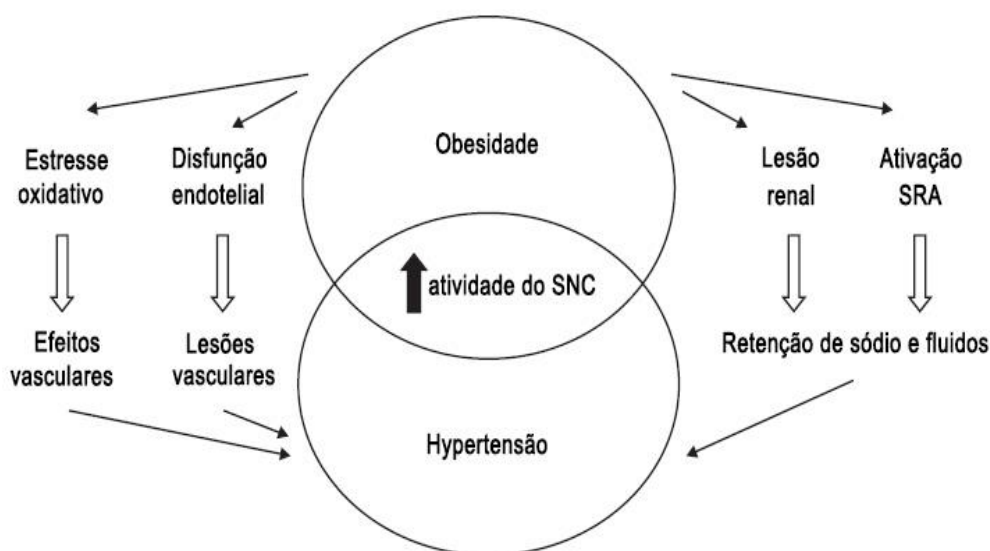
A disfunção endotelial tem sido detectada em coronárias, vasos de resistência e vasos de condutância, desta maneira a disfunção endotelial pode ser considerada como uma condição sistêmica (Flammar et al., 2012). Já é bastante

documentado na literatura a associação entre a disfunção endotelial e a maioria das condições que predispõem a aterosclerose e doenças cardiovasculares, como a hipertensão (Panza et al., 1990; Treasure et al., 1992), tabagismo (Zeicher et al., 1995), diabetes (Salmanoglu et al., 2016) e também a obesidade (Steinberg et al., 1996; Flamm et al., 2012).

O acúmulo excessivo de gordura também está intimamente associado a hipertensão. Estudos epidemiológicos demonstraram que o sobrepeso prediz o desenvolvimento futuro de hipertensão ((Stokes et al, 1989, Kannel, 2000) e de acordo com o NHANES III (“Third National Health and Nutrition Survey”) o risco de desenvolver hipertensão é ainda muito mais alto em pessoas obesas.

A hipertensão relacionada a obesidade é uma doença crônica de desenvolvimento lento e de origem multifatorial, e os múltiplos potenciais mecanismos que contribuem para o desenvolvimento no aumento da pressão sanguínea em humanos obesos vão desde a hiperinsulinemia, ativação do sistema renina angiotensina, aldosterona, estimulação do sistema nervoso central, níveis anormais de adipocinas e citocinas que agem sobre o endotélio vascular (FIGURA 4) (Vanecková et al., 2014).

FIGURA 5. Relação entre a obesidade e hipertensão



Mecanismos pelos quais a obesidade pode causar a hipertensão (adaptado de Vanecková et al., 2014).

Ainda no contexto da obesidade, o acúmulo excessivo de tecido adiposo é também um fator de risco para doenças coronarianas cardíacas (CHD). Estudos mostraram que com o aumento do IMC, aumentam também a frequência cardíaca de repouso e a pressão sistólica ou diastólica (Avogaro e Kreutzenberg, 2005). Em adição a hipertensão e aterosclerose que se instalam na obesidade, também é verificado a presença de doenças macrovasculares e microvasculares (macroangiopatia, microangiopatia) (Petrica et al., 2009; Singleton et al., 2003) além de disfunção endotelial (Kraemer-Aguiar et al., 2010, 2015, Panazzolo et al., 2012).

O desenvolvimento da obesidade e sua associação com as complicações metabólicas são bastante estudados em modelos animais como roedores, pois possuem bastante similaridade com a obesidade em humanos. Linhagens de ratos e camundongos são suscetíveis a desenvolver obesidade com dietas hiperlipídicas (HFD) em um período de 2 a 4 meses (Duarte et al., 2012; Vickers et al., 2011, Fellmann et al., 2013).

Além disso, na obesidade ocorrem alterações vasculares estruturais. Dados mostram que a massa corporal e a região de deposição da gordura prejudicam o remodelamento vascular, que por sua vez potencializa a mortalidade por doenças cardiovasculares (Martinez-Martinez 2013, Laurent et al, 2005).

1.4. JUSTIFICATIVA

O aumento da incidência de obesidade no mundo está relacionado principalmente aos maus hábitos alimentares que se baseiam no consumo de alimentos industrializados, hipercalóricos, *fast foods*, e na ingestão de porções exageradas sem qualidade nutricional, ou seja, com alto conteúdo de gorduras e o baixo teor de fibras.

Esse padrão inadequado de nutrição, juntamente com a redução da atividade física é relevante e proporcionalmente mais elevado nas famílias de baixa renda e com prevalência na população de adultos. Contudo, esse quadro já está sendo observado em crianças e adolescentes.

A associação da obesidade com o aumento da morbidade e mortalidade é em grande parte, devido a doenças cardiovasculares. No Brasil, em 2014 mais de 50 % das pessoas estão com sobrepeso, enquanto 8% já apresentam o quadro de diabetes e quase 25% já possuem hipertensão, que por sua vez é responsável por pelo menos 40% das mortes por acidente vascular cerebral, por 25% das mortes por doença arterial coronariana e, em combinação com o diabetes, 50% dos casos de insuficiência renal terminal (Vigitel, 2014)

Assim, a obesidade por si só é uma doença integrante do grupo de doenças crônicas que são não transmissíveis e acarreta prejuízos à saúde dos indivíduos. Estudos apontam a correlação entre a obesidade e a inflamação crônica de baixo grau a qual promove um desequilíbrio metabólico desencadeando o desenvolvimento de doenças crônicas como resistência à ação da insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão e outros problemas cardiovasculares. Na literatura científica, é grande o número de trabalhos sobre as patologias relacionadas às complicações decorrentes do acúmulo de gordura nos tecidos adiposos quando estas já estão estabelecidas. Contudo, ainda é escasso o conhecimento sobre o momento e ordem cronológica em que essas alterações começam a se desenvolver em indivíduos durante o ganho de peso em direção a obesidade.

Desta maneira, avaliamos de forma cinética durante 24 semanas o desenvolvimento de alterações no perfil inflamatório, da resistência à insulina, função endotelial e cardiovascular na obesidade experimental.

2. OBJETIVO

O objetivo principal desse trabalho foi identificar e estabelecer em quais momentos durante a evolução da obesidade inicia-se a instalação da inflamação crônica de baixo grau, resistência à insulina, disfunção endotelial e cardiovascular em ratos *Wistar* alimentados durante 24 semanas com dieta hiperlipídica.

2.1. Objetivos Específicos

Os distúrbios fisiológicos que ocorreram nos ratos durante o período de indução da obesidade foram avaliados a cada seis semanas até a finalização de 24 semanas de experimentos. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a função endotelial a cada seis semanas frente as diferentes dietas;
- Avaliar a sensibilidade à insulina a cada seis semanas frente as diferentes dietas;
- Avaliar a pressão arterial a cada seis semanas frente as diferentes dietas;
- Avaliar a biodisponibilidade do óxido nítrico na corrente sanguínea dos animais a cada 6 semanas frente as diferentes dietas;
- Analisar as alterações morfológicas na aorta dos animais a cada seis semanas frente as diferentes dietas;
- Analisar a força de contração cardíaca dos animais a cada 6 semanas frente as diferentes dietas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rathus norvegicus* var, *albinus*, Rodentia, Mamalia) com 6 semanas de vida obtidos no biotério da Universidade Federal de São Carlos.

No Biotério do Laboratório de Nutrição e Metabolismo aplicados ao Exercício desta universidade, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com temperatura controlada entre 22 e 24°C e aplicados ciclos de luz (claro e escuro) de 12h.

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos de 35 animais e a cada 6 semanas, sete animais de cada grupo foram aleatoriamente eutanasiados. O protocolo experimental teve duração de 24 semanas e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA, processo nº 026-1013).

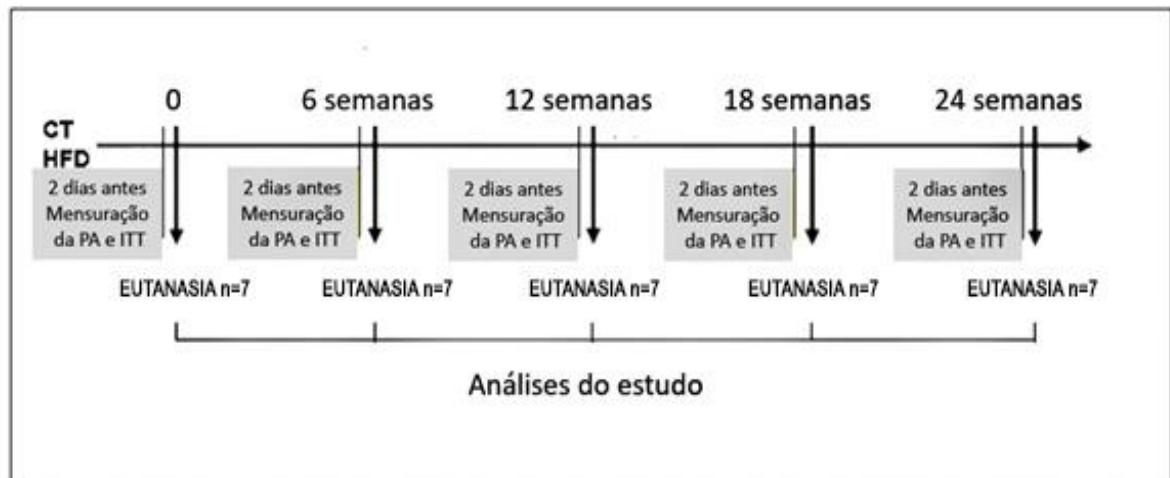
3.2. Grupos Experimentais

Os grupos experimentais de análise foram identificados como:

Grupo Controle (CT): 35 animais alimentados com dieta padrão durante 24 semanas. Sendo a cada 6 semanas, sete animais eutanasiados aleatoriamente para análises deste estudo (Figura 5)

Grupo Dieta Hiperlipídica (HFD): 35 animais alimentados com dieta hiperlipídica durante 24 semanas para indução da obesidade. Sendo a cada 6 semanas, sete animais sacrificados aleatoriamente para análises deste estudo (Figura 5)

FIGURA 6. Protocolo experimental



3.3. Dieta Padrão

Como dieta padrão, utilizou-se uma ração balanceada da marca PRIMOR (São Paulo, Brasil). A composição nutricional conforme a especificação do fornecedor é para cada 100g: 23g de proteína; 49g de carboidrato; 4g de gordura; 5g de fibra; 7g de cinza; e 6g de vitaminas.

3.4. Dieta Hiperlipídica

Foi empregada uma dieta hiperlipídica para desenvolver obesidade em ratos, padronizada por Estadella (2004). Essa dieta foi preparada pela mistura de: 15g de ração balanceada da marca PRIMOR; 10g de amendoim torrado; 10g de chocolate ao leite; 5g de bolacha maisena. Todos os ingredientes foram moídos e misturados na proporção de 3:2:2:1.

A densidade calórica das dietas foi determinada empregando-se um calorímetro adiabático (IKA-C400). Os resultados dessa análise estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Composição nutricional da dieta padrão e hiperlipídica.

Macro nutrientes	Dieta padrão Primor® (g/100g)	Dieta Hiperlipídica (g/100g)
Carboidratos	49	48
Proteínas	23	20
Gorduras totais	4	20
Fibras	5	4
Valor energético	4.07 kcal/g	5.12 kcal/g

Bromatologia: Speretta et al., (2012)

3.5. Controle de Peso e Consumo Alimentar

Durante todo o período experimental, o peso corporal e o consumo alimentar de cada animal foram controlados diariamente. Os valores obtidos pela pesagem em balança analítica foram anotados em fichas individuais (DÂMASO, 1996).

3.6. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Ao todo foram realizadas cinco conjuntos de resultados medidos a cada 6 semanas, ou seja, nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 semanas de nutrição, dois dias antes da data da eutanásia dos animais.

A curva glicêmica foi obtida pela análise do sangue, por onde uma alíquota de sangue foi coletada pela cauda e a glicemia avaliada através de fita e glicosímetro (Accu-check), (Ropelle et al., 2006). A primeira coleta de sangue foi realizada após jejum noturno de 8 h (tempo 0 da análise). Após isso, a insulina (1U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram nos tempos: 0, 15, 30 e 45 minutos.

3.7. Coleta de Amostras

Após a decapitação dos ratos em guilhotina, o sangue e os tecidos adiposos: brancos retroperitoneal (RET), epididimal (EPI) e visceral (VIS) foram coletados. A soma do peso dos três tecidos foi chamada de Gordura Visceral Total (GVT) (Cho et al., 2012)

3.8. Níveis Séricos de Triglicérides

Os triglicérides foram avaliados empregando-se o método enzimático colorimétrico específico através do kit Triglicérides Liquiform Labitest. (Schiavo et al., 2002)

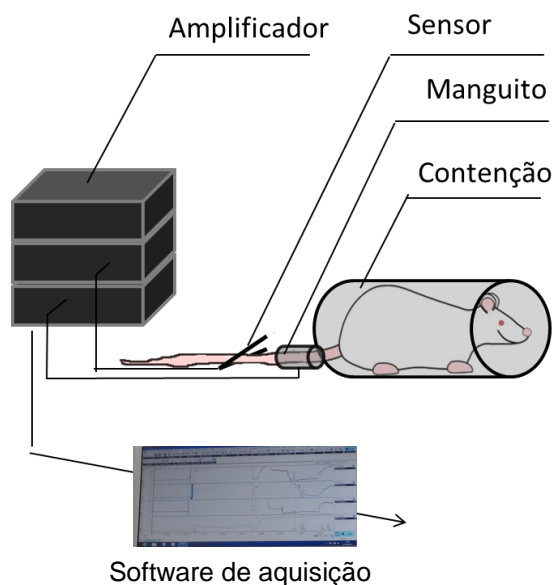
3.9. Determinação da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica foi determinada em animais não anestesiados por pletismografia de cauda.

Os ratos foram introduzidos em um aparato de contenção e mantidos em um ambiente tranquilo e silencioso por 1 hora. Esse procedimento foi repetido algumas vezes antes das análises, com a finalidade de deixá-los familiarizados com o teste.

Uma abotoadura emborrachada e um sensor fotoelétrico de pulsação foram colocados ao redor da cauda. Esse sensor é conectado a um amplificador (NIPREM 645, Cibertec, Madrid, Spain), e as pulsações gravadas no PowerLab (AD Instruments, Castle Hill, NSW, Austrália). Foram realizadas 3 medidas consecutivas, considerando-se como o valor da pressão a média aritmética desses resultados. A Figura 5 ilustra o procedimento utilizado para a realização desse experimento.

FIGURA 7. Procedimento ilustrativo da medição da pressão sanguínea em ratos



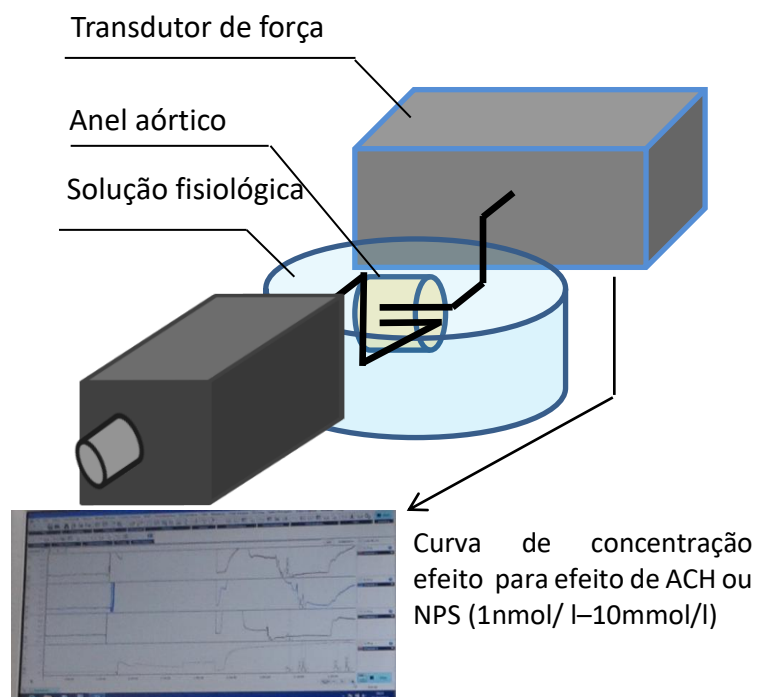
3.10. Estudo da Reatividade Vascular em Aortas Isoladas

Para o registro da tensão isométrica, utilizamos preparações da aorta torácica isoladas de ratos. Após eutanásia dos animais, as aortas foram isoladas e dissecadas de tecido conjuntivo e cortadas em anéis de 4 mm de comprimento. Os anéis de aorta foram montados entre dois ganchos de metal e mantidos em câmara para órgão isolado contendo 5 mL de solução fisiológica de Krebs (com a seguinte composição em mmol/L: NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5) em pH 7,4, sob gaseificação com mistura de carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), a 37 °C. Para estabilização, as preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal de 1,5g (pré-determinada pela curva de tensão com KCL). A tensão isométrica foi obtida pelo transdutor (Letica Scientific Instruments; Barcelona–Spain) conectado a um amplificador (PowerLab/415 - ADInstruments) e registrada em computador. Foram realizadas curva de concentração efeito para acetilcolina (0.1nM a 0.1mM) em anéis aórticos com endotélio íntegro. A integridade do endotélio foi verificada através da contração dos anéis com fenilefrina (0.1µmol/l), e após estabilização da contração máxima (considerado 100%) foi aplicado 1µmol/l acetilcolina para ocasionar o relaxamento do anel, se este relaxamento foi maior que 80% da contração máxima, este anel foi considerado com o endotélio íntegro.

Com o objetivo de verificar a função da musculatura lisa vascular, foram também realizadas curvas de concentração efeito para nitroprussiato de sódio (0.1nM a 0.1mM), conhecido doador de NO, em anéis aórticos onde o endotélio foi removido mecanicamente. A efetividade dessa remoção foi demonstrada pela ausência de relaxamento à acetilcolina (1µmol/L) em aortas pré-contraída com fenilefrina (0,1µmol/L) (Figura 7).

Os dados foram plotados, e a potência (pd2) e o relaxamento máximo (Emax) foram calculados.

FIGURA 8. Esquema ilustrativo da realização do protocolo de estudo da reatividade vascular em artérias isoladas.



3.11. Análise Histológica

Foram coletados trechos de 5 milímetros da parte ascendente da aorta a partir de sua raiz situada na região adjacente à base do coração. As amostras foram embebidas na solução fixadora de Karnovsky modificada, contendo solução de glutaldeído 3% (Merk, Alemanha) e formalina 10% por 72 horas.

Em seguida, o material foi lavado em água corrente, submetido à desidratação com passagens sucessivas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70% a 100%) e diafanizado pelo xilol.

A inclusão foi feita em parafina histológica. Foram feitos cortes de 6 μ m de espessura em um micrótomo (Leica, DMR) e coletados em laminas de vidro para

microscopia. Desparafinizados em estufa a 58° C e banhados em séries de xilóis, hidratados em soluções de concentrações decrescentes de etanóis e lavados em água destilada.

Foi realizada coloração com Hematoxilina –Eosina (HE) e utilizado para aquisição de imagem o “Scanner” Panoramic Desk” (3DHISTECH, Budapest, HUNGARY) Os diâmetros externos (De) foram obtidos pela medida das superfícies da adventícia e o diâmetro interno (Di) desde a superfície do endotélio; a δ da túnica média foi obtida dividindo-se por 2 a diferença entre o De – Di ($\delta = (De - Di)/2$) e a razão média/luz foi obtida pela razão entre a δ e o Di ($R_{m/lz} = \delta/Di$) (Coura et al., 2012). Foi utilizada objetiva de 40X para digitalizar lâminas histológicas coradas, e para análise das medidas de espessura e diâmetros internos em μm foi utilizado o software Image J (public domain Java image processing program, NIH).

3.12. Determinação Sérica de Adiponectina, IL-6, TNF- α e Proteína C Reativa.

As quantificações de citocinas e adipocinas foram realizadas a partir da coleta do soro e determinadas pelo método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA), seguindo as especificações correspondentes nos Kits.

Para as análises de citocinas como, IL-6, TNF- α foram utilizados kits OptEIA (BD Biosciences); para as análise Proteína C-reativa (PCR) e adiponectina foram utilizados kits DuoSet® ELISA (R&D Systems).

O sangue coletado foi acondicionado em tubos sem anticoagulante por aproximadamente 2 horas até a sua coagulação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos. O soro resultante desta centrifugação foi aliqotado em microtubo e congelado a -80°C.

De modo geral, a técnica se baseia no modelo ELISA sanduíche: as microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas e permaneceram “overnight”. As placas foram lavadas 3 vezes com 300 μl /poço de PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com a solução bloqueadora contendo albumina (PBS pH 7,2 + 4% Albumina bovina) por 1h, a 25° C \pm 2°.

Após mais ciclos de lavagens, foram adicionados às amostras e efetuados curvas padrão de citocinas recombinantes. As placas foram mantidas a 25°C por

2 horas e, em seguida, foi realizada uma nova lavagem. Foram então adicionados anticorpos anti-citocinas biotinilados ou conjugado com enzima peroxidase e mantidos por 1 hora e 30 minutos a TA. Após 5 lavagens com PBS-Tw, foi adicionado 100 µl da solução reveladora contendo 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi bloqueada com 50 µl de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada no espectrofotômetro 450 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml ou ng/ml dependendo do kit.

As dosagens foram realizadas a partir da coleta do soro do sangue e determinadas pelo método ELISA ou ELISPOT (Ensaio imunoenzimático em fase sólida), seguindo as especificações correspondentes ao Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) para cada uma das citocinas em ratos de acordo com as descrições de Cavaglieri et al. (2003). Todas as amostras para determinação das concentrações das citocinas circulantes foram realizadas em triplicata, para garantir a precisão dos resultados obtidos.

3.13. Determinação sérica de NO (Nitrito/Nitrato-NOx)

Para a medida de NO no soro, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio, empregando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instrument Bouler, CO. USA).

Das amostras desproteinizadas, utilizou-se o volume de 5.0µL que foi injetado na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCL a 95° C) que converte o nitrito em NO, em quantidades equimolares. O NO é sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador, que por sua vez reage com o ozônio (O₃) formando dióxido de nitrogênio (NO₂⁻). O NO₂⁻ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico em que área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 15, 25, 50 e 100 µM (Pereira et al., 2014)

3.14. Determinação dos Níveis de Hidroperóxidos de Lipídios (FOX)

Os hidroperóxidos de lipídios são indicadores do processo de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica foi quantificada pelo método FOX (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange), como descrito por Jiang et al., (1992).

O método FOX é baseado na oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal) a Fe^{3+} pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe^{3+} , o alaranjado de xilenol. Cerca de 30 μg de aorta dos ratos (previamente tratada com TCA 10%) foi incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente com 900 μL de mistura reativa contendo 100 μM de alaranjado de xilenos, 250 μM de FeSO_4 (sulfato ferroso amoniacal), 25 mM de H_2SO_4 e 4 mM de butilato de hidroxitolueno (BHT) em metal 90% (v/v). O Fe^{3+} formado na presença de hidroperóxidos reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido com pico de absorção em 560 nm.

Para o cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $4,3 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ do complexo Fe^{3+} alaranjado de xilenol para H_2O_2 , hidroperóxido linoleico ou butil hidroperóxido.

Os resultados foram expressos em nmol de hidroperóxido por mg de proteína. O método “Xilenol Orange” é simples, não exige equipamentos sofisticados, os resultados são reprodutíveis e avalia efetivamente o conteúdo de hidroperóxidos de lipídios em extratos de tecidos (Hermes-Lim et al., 1995). O ensaio FOX apresenta boa correlação com o ensaio TBARS (Storey, 1996).

3.15. Análise da Contratilidade cardíaca

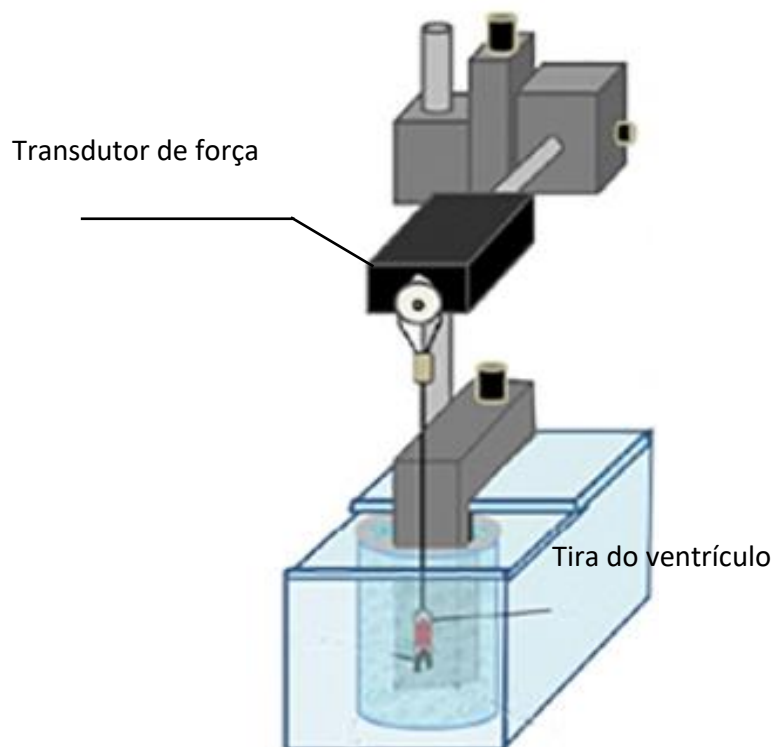
Imediatamente após o sacrifício dos animais, o coração foi retirado e tiras ventriculares foram preparadas, após a cuidadosa separação dos ventrículos dos átrios e do seio venoso. A seguir, as tiras foram transferidas para cubetas termostalizadas de 20 mL já contendo solução fisiológica de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (em mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl_2 1.25, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, NaHCO_3 23 e glucose 11) a 30°C e pH = 7.4. Esta solução foi continuamente borbulhada por uma solução de carbogênio (2% CO_2 , São Carlos Gases®).

As preparações foram suspensas utilizando uma haste metálica de forma que uma das extremidades se mantenha interligada a um transdutor de força

isométrica (AVS, Solução Integrada Ltda.), conectado a um amplificador (AECAD 04, AVS, Solução Integrada Ltda., Brasil) o qual envia o sinal a um sistema de aquisição e tratamento de dados (ANCAD, AVS, Solução Integrada, Ltda, Brasil), enquanto a outra extremidade da tira será fixada a um gancho construído na parte final de um eletrodo de platina. Esse eletrodo e um outro, posicionado no interior do banho, permanecem conectados a um estimulador (AVS 100C4, Solução Integrada Ltda., Brasil) que envia pulsos elétricos quadrados com 12 ms de duração e uma voltagem 50% superior ao limiar, com o intuito de garantir uma estimulação máxima ao longo de todo o experimento (Figura 8). As preparações foram estiradas até que se obtivesse uma relação constante entre o comprimento da preparação e a força de contração desenvolvida. Por fim, as preparações foram estabilizadas por um período de 40 minutos à frequência de estimulação de 0,5 Hz.

A contratilidade do miocárdio foi testada mensurando a resposta inotrópica a mudanças na concentração de cálcio extracelular (Ca^{2+} , 0.65 to 5.0 mM).

FIGURA 9. Esquema ilustrativo da realização do protocolo de estudo da força de contração isométrica em tiras musculares isoladas.



3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

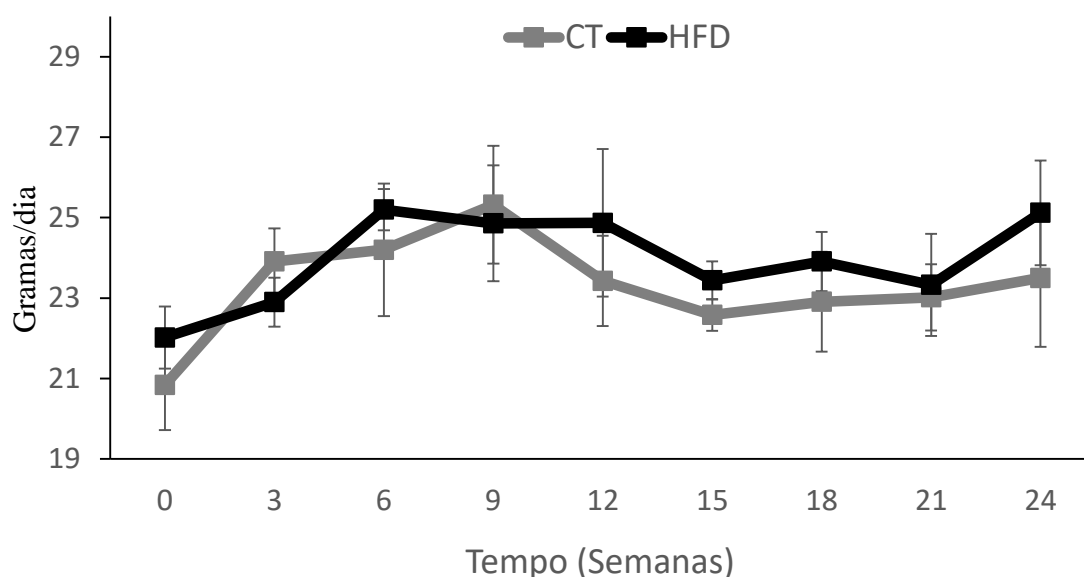
Os dados foram tratados por procedimentos estatísticos compatíveis com os objetivos propostos utilizando o software STATISTICA 7 (Statsoft inc. Tulsa. USA). Primeiramente foram realizados a verificação da normalidade dos dados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade por Levene, e foi verificado que todos os parâmetros mensurados neste estudo puderam ser analisados por testes estatísticos paramétricos. Os testes posteriores realizados em todas as análises foi o teste de variância Anova Two-Way, e para identificar onde as diferenças ocorreram, foi utilizado o teste de Post-hoc Newman Keuls. Para as conclusões das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Foram realizadas correlações de Pearson entre pD2 e pressão sanguínea; entre pD2 e VAT. Todos os dados estão expressos como Média e Erro padrão da média.

4. RESULTADOS

4.1. Consumo Alimentar, Massa Corporal e Gordura Visceral Total (GVT)

Como observado na Figura 10, não houve diferenças significativas no consumo alimentar entre os animais do grupo controle (CT) e dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica (HFD) ao longo das 24 semanas do protocolo experimental.

FIGURA 10. Consumo alimentar dos grupos CT e HFD durante as 24 semanas de protocolo experimental.



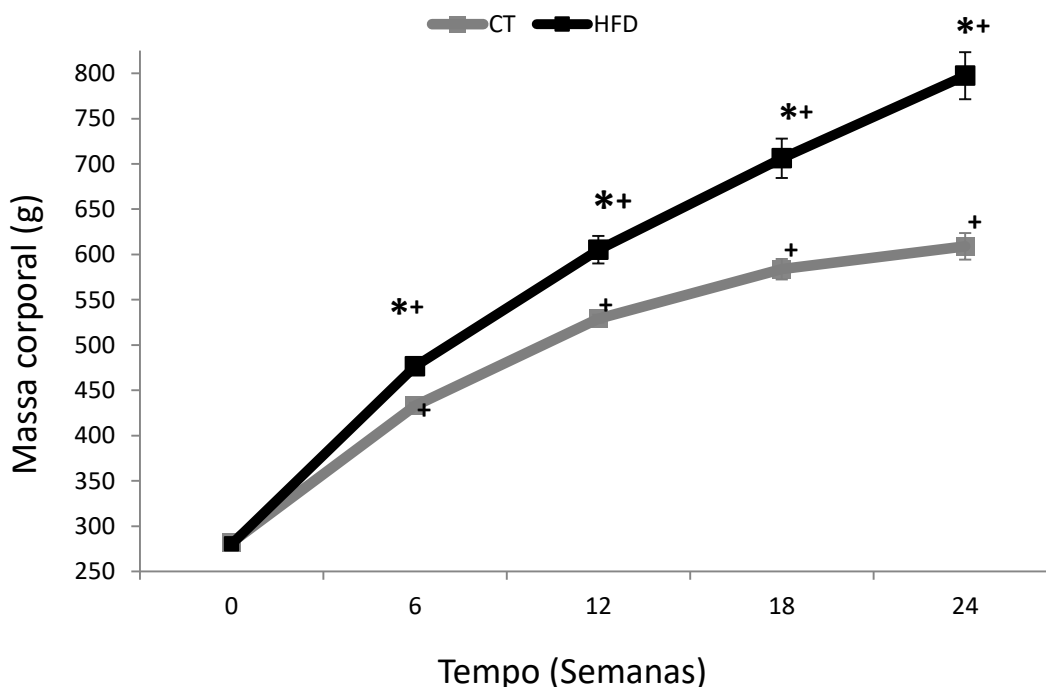
Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD.

Entretanto nos animais que foram submetidos a dieta hiperlipídica - HFD – houve aumento significativo da massa corporal já em 6 semanas (Figura 11) quando comparado com o grupo CT (CT: 432,86 ± 3,32; HFD: 476,25 ± 6,95; p<0,05), verifica-se ainda que no grupo alimentado com a dieta hiperlipídica, a massa corporal foi significativamente maior que a observada no grupo controle em todos os tempos subsequentes observados neste estudo, em 12 semanas: (CT:529,01 ± 4,49; HFD: 605,22 ± 15,23; p<0,05), em 18 semanas (CT: 583,82± 11,3; HFD: 706,06 ± 21,71; p<0,05) e em 24 semanas (CT: 609,14± 14,67; HFD:

797,31 ± 26,01; p < 0,05). Tanto no grupo HFD, quando no grupo CT observa-se um aumento constante de peso ao longo das semanas, sendo este aumento mais pronunciado no grupo HFD.

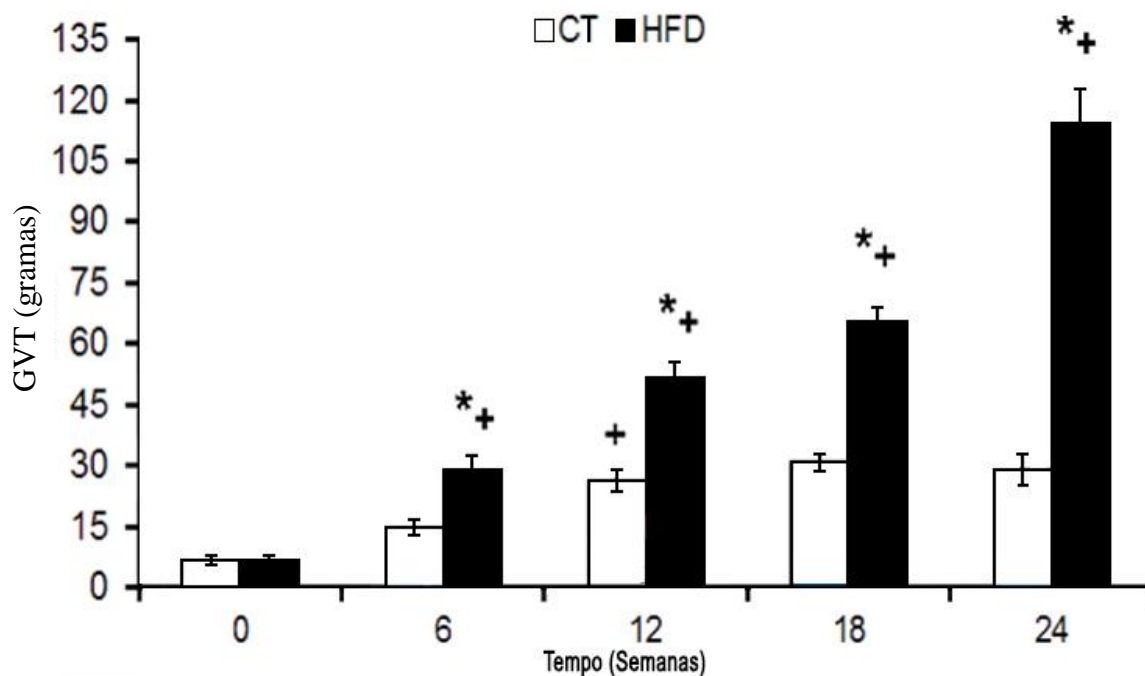
Em relação à soma dos pesos da gordura retroperitoneal, epididimal e visceral – GVT, (Figura 12) verificamos que a partir de 6 semanas de dieta hiperlipídica a GVT aumentou significativamente no grupo HFD em relação ao CT (CT: 14,73 ± 1,71; HFD: 29,09 ± 3,43; p < 0,05). Podemos também observar que no grupo HFD, a GVT é significativamente maior que no grupo controle em todos os tempos observados neste estudo, praticamente aumento de 100% em 12 semanas: (CT: 26,09 ± 2,77; HFD: 51,98 ± 3,43; p < 0,05), em 18 semanas (CT: 30,85 ± 2,08; HFD: 65,69 ± 2,96; p < 0,05) e aumento mais de 350% em 24 semanas (CT: 29,00 ± 3,72; HFD: 114,29 ± 8,28; p < 0,05). No grupo controle observamos que ocorreu aumento na GVT a partir da 12ª semana quando comparado com os valores de 6 semanas (CT 6 semanas: 6,87 ± 0,76; CT 12 semanas: 26,09 ± 2,77 p < 0,05).

FIGURA 11. Evolução da massa corporal nos grupos CT e HFD.



Resultados estão expressos em média ± EPM (n = 7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p < 0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

FIGURA 12. Evolução da Gordura Visceral Total (GVT -epididimal, visceral e retroperitoneal).

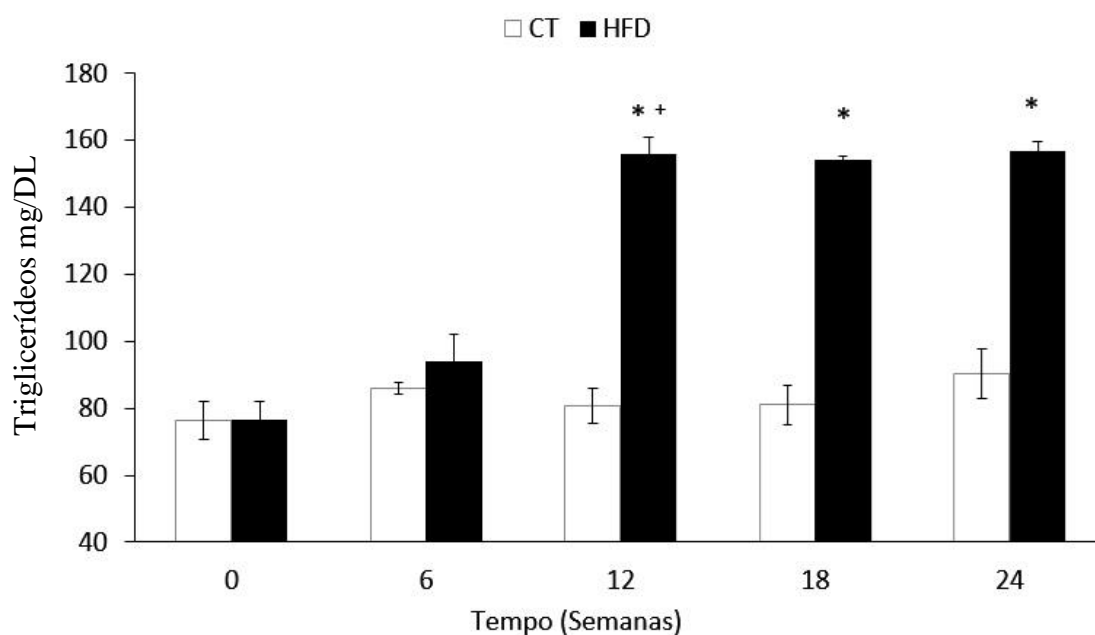


Resultados estão expressos em média \pm EPM (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

4.2. Concentração de Triglicerídeos Séricos

Com relação aos Triglicerídeos (Figura 13), observamos aumento em seus níveis no grupo HFD em relação ao controle a partir da 12ª semana de tratamento (CT: $80,85 \pm 2,12$; HFD: $155,77 \pm 5,07$, P<0,05), e continuou elevado em 18 semanas (CT: $80,94 \pm 5,21$; HFD: $153,96 \pm 1,49$ p<0,05) e 24 semanas (CT: $90,29 \pm 2,82$; HFD: $156,68 \pm 3,45$; p<0,05). Não houve alteração nos níveis de triglicerídeos no grupo controle ao longo de todo o período experimental.

FIGURA 13. Triglicerídeos séricos durante as 24 semanas



Resultados estão expressos em média \pm EPM. (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

4.3. Tolerância a Insulina

Para diagnosticar se a dieta hiperlipídica foi capaz de alterar a sensibilidade à insulina, realizamos o teste de tolerância a insulina (ITT). No grupo HFD podemos verificar que a dieta induziu queda na tolerância (Figura 15) à insulina após 6 semanas de tratamento, enquanto que não houve alterações neste parâmetro ao longo do período experimental entre os grupos CT (Figura 14). Na Figura 16 observamos que a área sob a curva (AUC) no grupo HFD é maior em 6 semanas (CT: 3022,66 \pm 46,62; HFD: 3577,71 \pm 64,48, p<0,05), 12 semanas (CT: 3109,50 \pm 55,27; HFD: 3731,66 \pm 25,34, p<0,05), 18 semanas (CT: 3139,00 \pm 32,23; HFD: 4213,00 \pm 89,73, p<0,05) e 24 semanas (CT: 3157,71 \pm 50,13; HFD: 4734,09 \pm 75,91, p<0,05) quando comparado a área de grupo CT.

FIGURA 14. Teste de tolerância a insulinas (ITT) no grupo CT em 0, 6, 12, 18 e 24 semanas

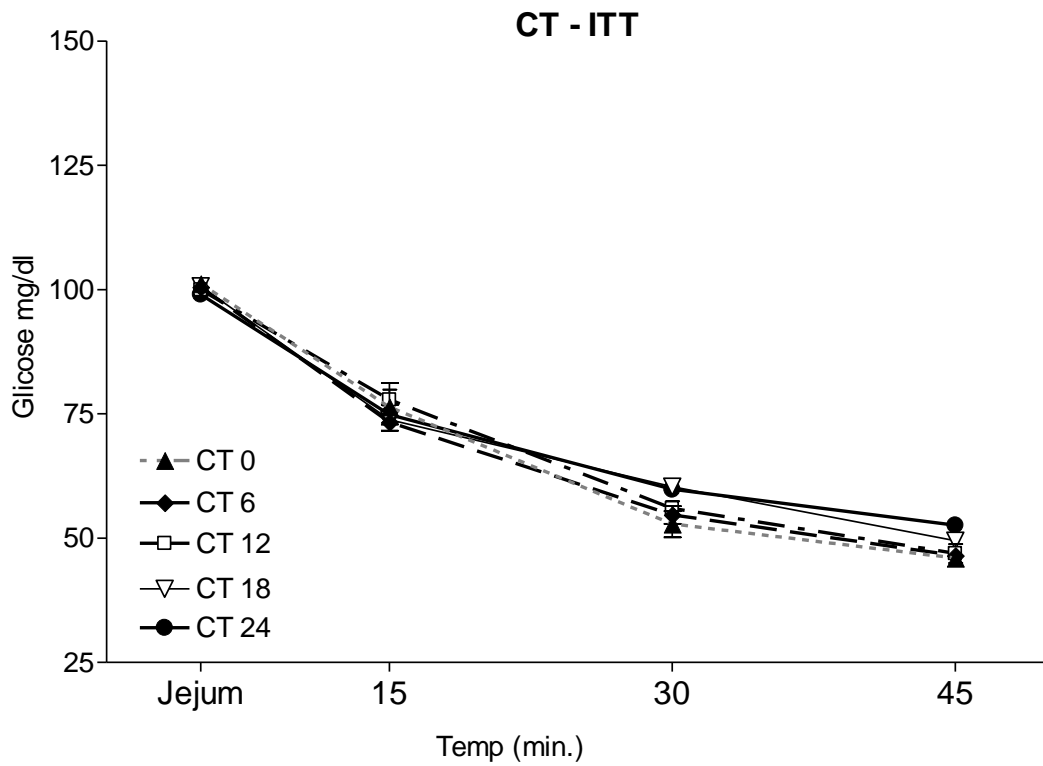


FIGURA 15. Teste de tolerância a insulinas (ITT) no grupo HFD em 0, 6, 12, 18 e 24 semanas.

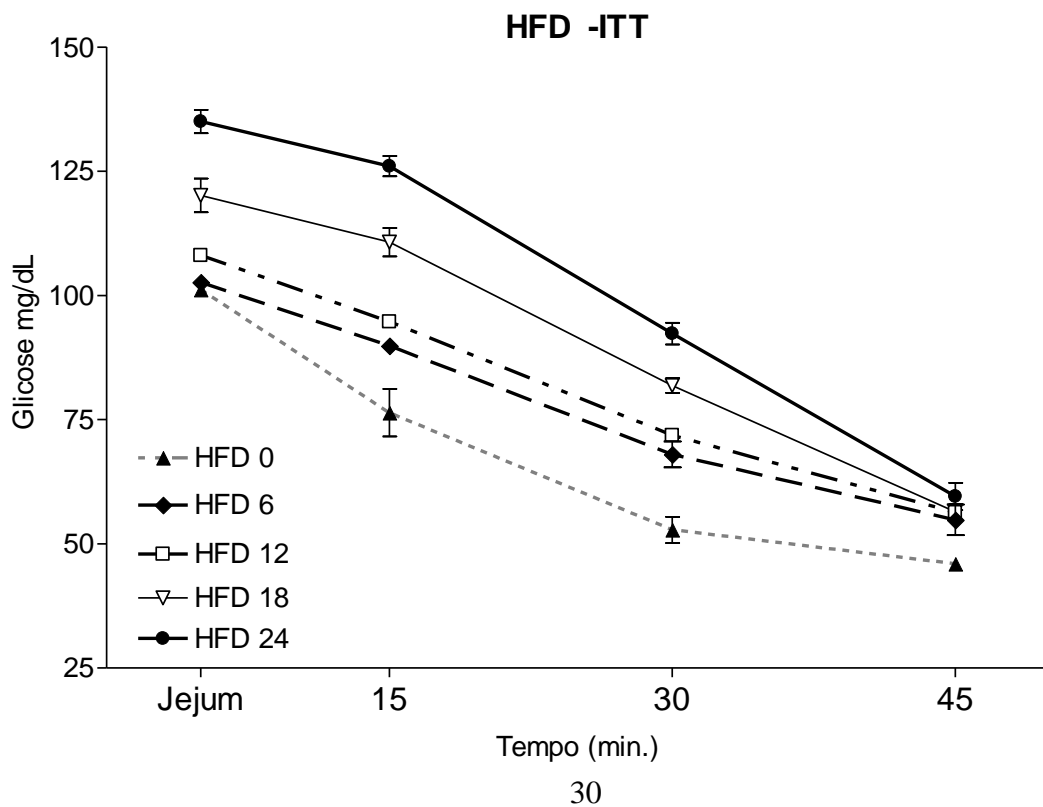
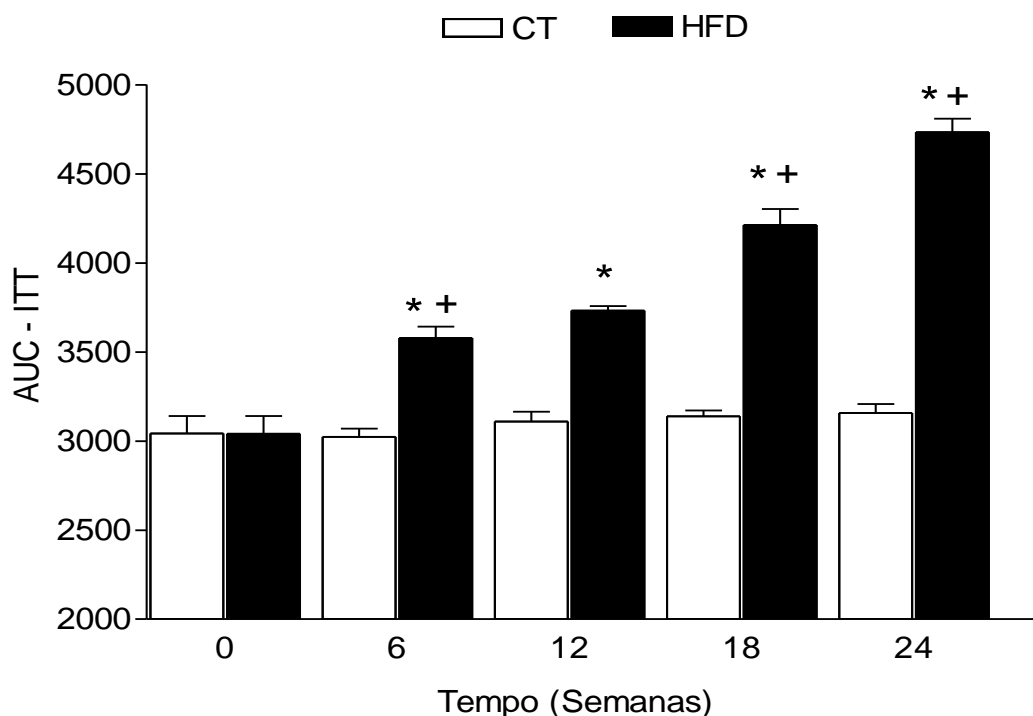


FIGURA 16. Área sob a curva do teste de tolerância a insulina (AUC -ITT) nos grupos CT e HFD

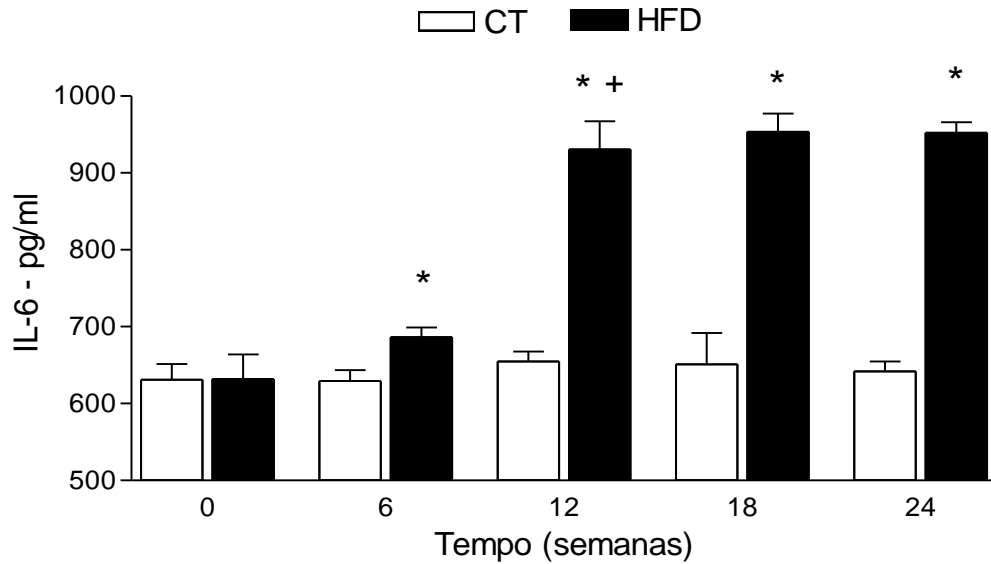


Resultados estão expressos em média \pm EPM (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas

4.4. Níveis séricos de IL-6, TNF- α , Adiponectina e PCR

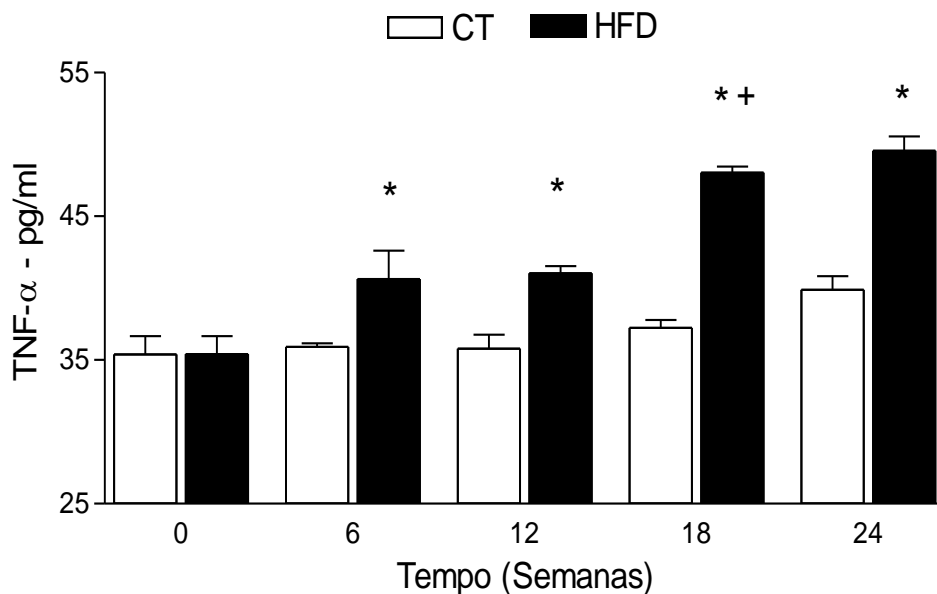
Podemos observar que em relação interleucina-6 (IL-6), o grupo HFD apresentou menores níveis circulantes deste marcador inflamatório já em 6 semanas de tratamento quando comparado ao CT (CT: $631 \pm 15,30$; HFD $672,76 \pm 12,2$; p<0,05) permanecendo maior em 12 semanas (CT: $654 \pm 12,60$; HFD $930,67 \pm 36,6$; p<0,05), 18 semanas (CT: $650,88 \pm 51,00$; HFD $953,70 \pm 23,7$; p<0,05) e 24 semanas (CT: $641,67 \pm 13,00$; HFD $952,17 \pm 13,8$; p<0,05), (Figura 17). O mesmo padrão de comportamento ocorreu na concentração do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), aumentando os níveis circulatórios em 6 semanas (CT: $35,90 \pm 0,25$; HFD $40,63 \pm 1,98$; p<0,05) e permanecendo mais alto em 12 semanas (CT: $35,79 \pm 0,96$; HFD $41,04 \pm 0,49$; p<0,05), 18 semanas (CT: $37,22 \pm 0,56$; HFD $48,04 \pm 0,41$; p<0,05) e em 24 semanas (CT: $39,89 \pm 0,95$; HFD $49,55 \pm 1,0$; p<0,05), (Figura 18).

FIGURA 17. Concentração sérica de IL-6 no grupo controle (CT) e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas



Resultados estão expressos em média \pm EPM (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

FIGURA 18. Concentração sérica de TNF- α nos grupos controle (CT), e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas

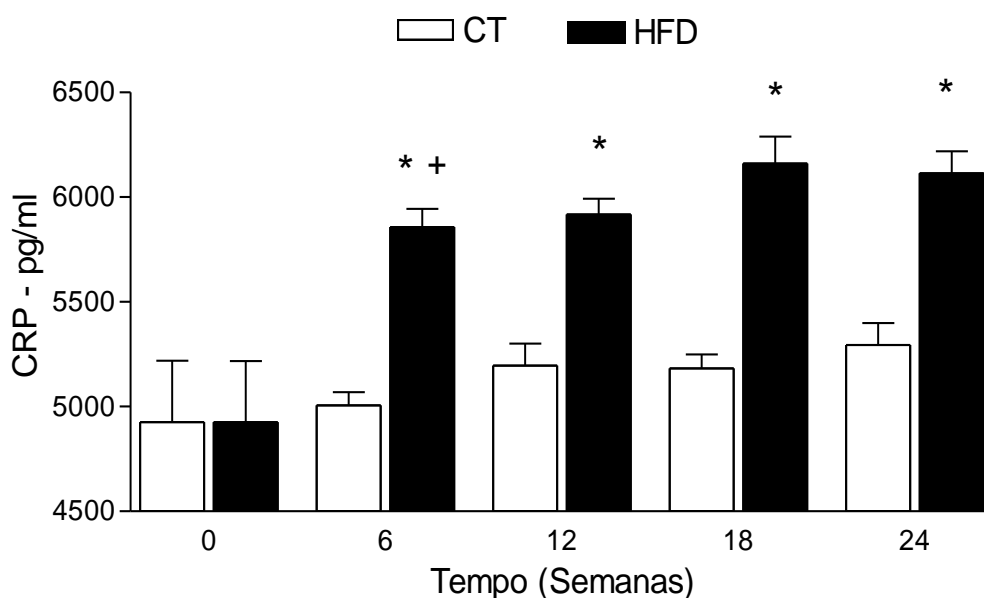


Resultados estão expressos em média \pm EPM (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT

comparado o grupo HFD; + $p < 0.05$, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas

No grupo alimentado com a dieta hiperlipídica, verificamos que os níveis de proteína C-reativa (CRP) aumentaram a partir de 6 semanas quando comparado o grupo controle (CT: $5005,95 \pm 63,08$; HFD: $5856,98 \pm 87,63$; $p < 0,05$), e assim permaneceram em 12 semanas (CT: $5195,49 \pm 105,95$; HFD: $5917,85 \pm 74,71,63$; $p < 0,05$), 18 semanas (CT: $5182,94 \pm 65,72$; HFD: $6160,74 \pm 127,79$; $p < 0,05$) e em 24 semanas (CT: $5294,65 \pm 105,12$; HFD: $6118,98 \pm 105,01$; $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (Figura 19).

FIGURA 19. Concentração sérica de CRP nos grupos controle (CT) e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas

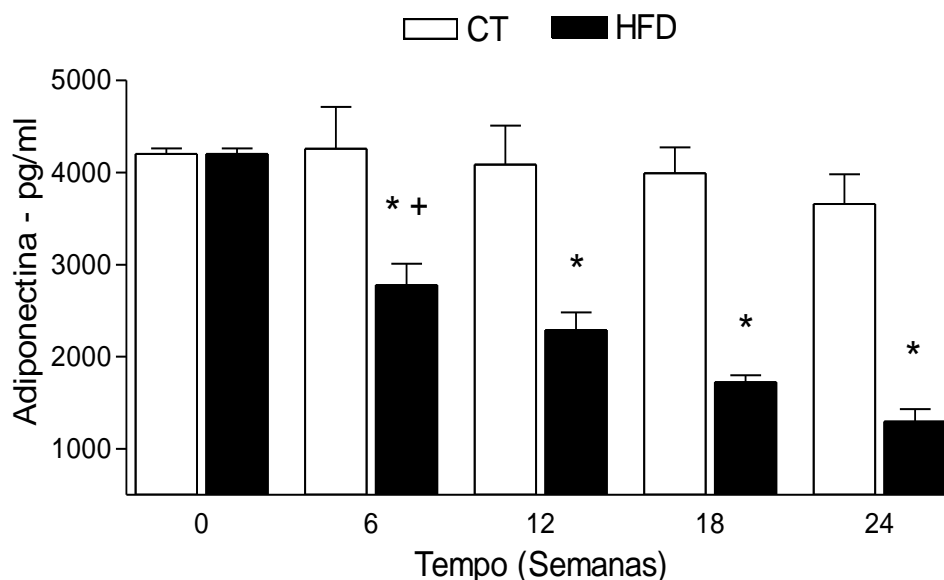


Resultados estão expressos em média \pm EPM ($n=7$). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. * $P < 0.05$, Grupo CT comparado o grupo HFD; + $p < 0.05$, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

Por outro lado, a concentração no soro da citocina anti-inflamatória Adiponectina (Figura 20) apresentou comportamento contrário as citocinas pró-inflamatórias, diminuindo sua concentração a partir de 6 semanas (CT: $4259,26,95 \pm 454,11$; HFD: $2777,31 \pm 231,79$; $p < 0,05$) e assim permanecendo em 12 semanas (CT: $4085,57 \pm 425,38$; HFD: $2290,31 \pm 191,95$; $p < 0,05$), 18 semanas (CT: $3994,18 \pm 279,9$; HFD: $1724,36 \pm 75,11$; $p < 0,05$) e 24 semanas (CT: $3658,12 \pm 322,41$; HFD: $1297,76 \pm 135,88$, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo CT. No grupo controle não

houve alteração nos níveis desta adipocina em nenhum momento em todo o período experimental.

FIGURA 20. Concentração sérica de Adiponectina nos grupos controle (CT) e alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) durante 24 semanas



Resultados estão expressos em média \pm EPM (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

4.5. Reatividade Vascular

Podemos observar na Figura 21, que os animais que se alimentaram de dieta padrão durante todo o período experimental não tiveram prejuízo na função endotelial ou seja a potência (pD2) de relaxamento induzida pela ACH não se alterou em nenhum momento avaliado neste estudo.

Por outro lado, como mostrado na Figura 22, a potência de relaxamento dependente de endotélio, pD2, induzido por acetilcolina foi prejudicado em aortas dos animais do grupo HFD já em 6 semanas (pD2: CT: $7,49 \pm 0,04$; HFD: $7,38 \pm 0,03$, p<0,05), 12 semanas (pD2: CT: $7,48 \pm 0,05$; HFD: $7,24 \pm 0,09$, p<0,05), 18 semanas (pD2: CT: $7,42 \pm 0,08$; HFD: $7,12 \pm 0,05$, p<0,05) e 24 semanas pD2: CT: $7,34 \pm 0,09$; HFD: $6,99 \pm 0,11$, p<0,05) quando comparado ao grupo CT.

Além disso, verificamos que a potência (pD2) que ocasiona 50% de relaxamento máximo em resposta a ACH piora com o passar do tempo no grupo HFD, o mesmo não ocorre na função endotelial do grupo controle (Figura 23).

Em anéis aórticos onde o endotélio foi retirado, não houve diferenças tanto na potência (pD2) quanto no relaxamento máximo independente do endotélio induzido por nitroprussiato de sódio (NPS) nos grupos CT e HFD em todos os tempos avaliados (Tabela 2), sinalizando que não houve prejuízo nas células musculares lisas em decorrência da dieta hiperlipídica.

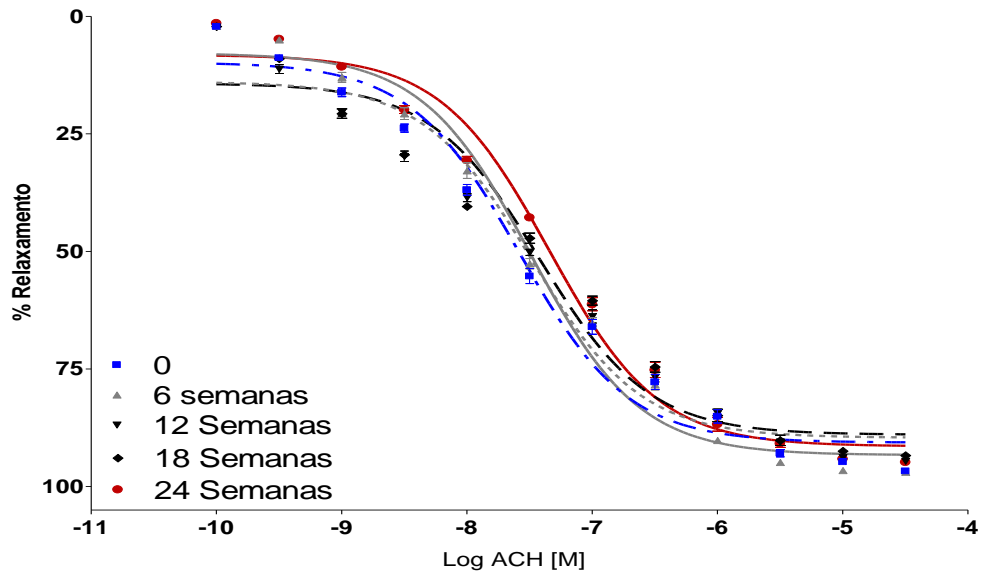
Além disso, verificamos forte correlação negativa entre a potência do efeito relaxante de acetilcolina (pD2) e a quantidade de gordura visceral total (GVT) ($r = -0,730$, $p < 0,01$).

TABELA 2: pD2 e Emax dos grupos CT e HFD durante as 24 semanas de protocolo experimental

Semanas	Com endotélio				Sem endotélio			
	pD2		Emax(%)		pD2		Emax(%)	
	CT	HFD	CT	HFD	CT	HFD	CT	HFD
0	7,58 ± 0,11	7,58 ± 0,10	90,67 ± 2,80	90,87 ± 2,76	8,69 ± 0,05	8,68 ± 0,09	103,8 ± 1,05	104,6 ± 1,28
6	7,52 ± 0,03	7,37 ± 0,04**	93,42 ± 2,62	90,31 ± 2,95	8,67 ± 0,07	8,66 ± 0,08	98,3 ± 1,60	100,2 ± 2,95
12	7,48 ± 0,14	7,24 ± 0,09**	89,17 ± 3,40	90,90 ± 2,95	8,69 ± 0,03	8,71 ± 0,04	102,5 ± 0,98	103,9 ± 1,30
18	7,42 ± 0,15	7,12 ± 0,10**	88,98 ± 3,79	89,34 ± 3,82	8,71 ± 0,04	8,69 ± 0,02	105,8 ± 1,43	104,3 ± 0,75
24	7,34 ± 0,09	6,99 ± 0,11**	91,46 ± 2,54	89,80 ± 3,27	8,69 ± 0,02	8,68 ± 0,04	105,9 ± 1,13	105,9 ± 0,81

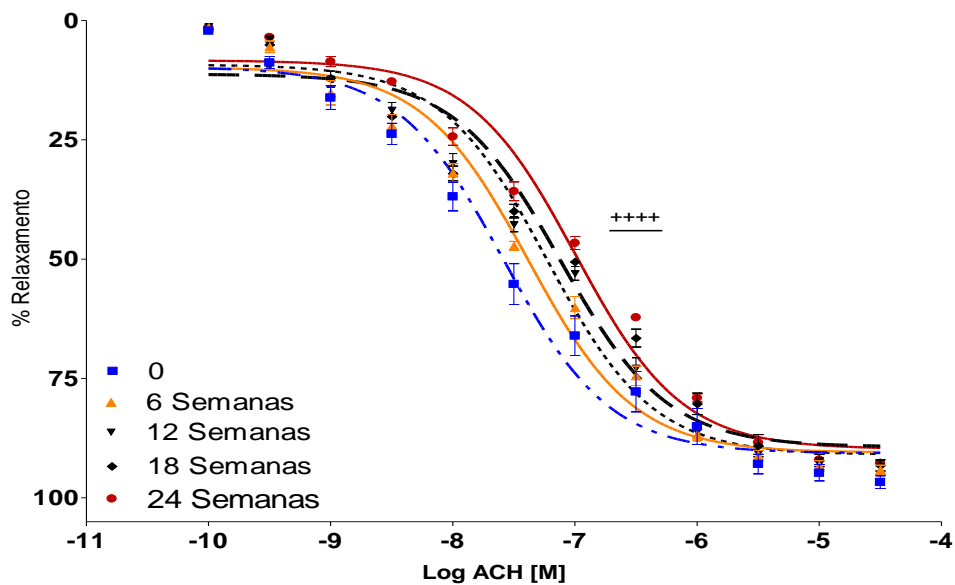
Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p < 0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

FIGURA 21. Curva concentração efeito para ACH dependente de endotélio induzido em anéis aórticos do grupo controle (CT) realizados no início do período experimental (0) e em 6, 12, 18 e 24 semanas.



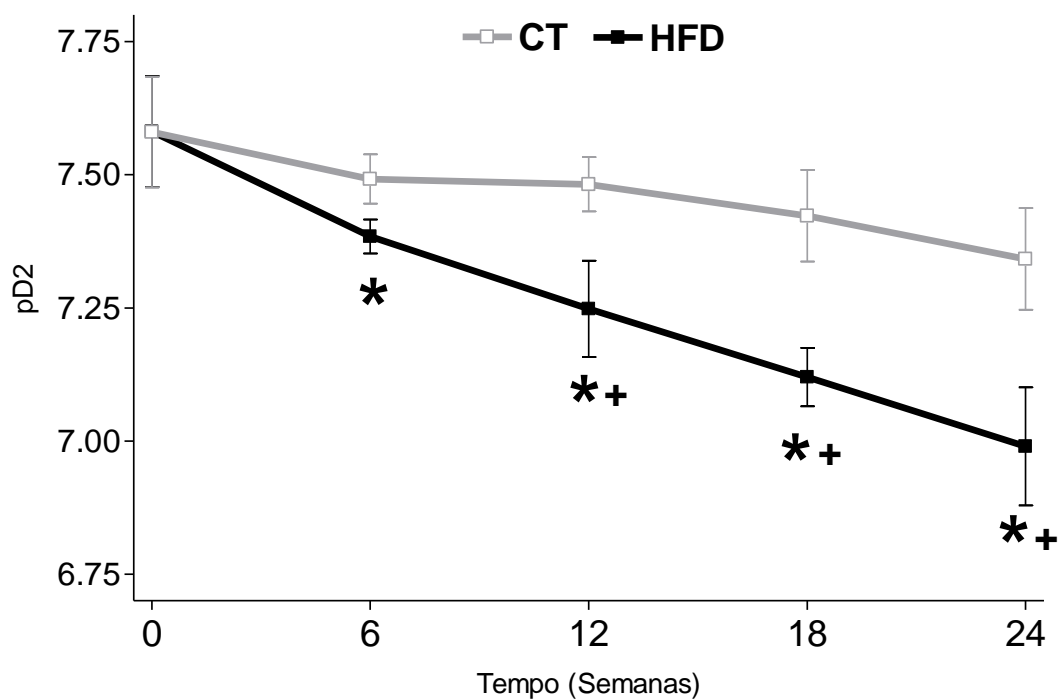
Comparações foram realizadas pelo teste ANOVA Two-Way seguido pelo teste de post- hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

FIGURA 22. Curva concentração efeito para ACH dependente de endotélio induzido em anéis aórticos do grupo alimentado com dieta hiperlipídica (HFD) realizados no início do período experimental (0) e em 6, 12, 18 e 24 semanas.



Comparações foram realizadas pelo teste ANOVA Two-Way seguido pelo teste de post- hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

FIGURA 23. Comparação entre a potência (pD2) de Relaxamento dependente de endotélio induzido por acetilcolina (ACH) em anéis aórticos do grupo CT e HFD realizados no início do período experimental (0) e em 6, 12, 18 e 24 semanas.

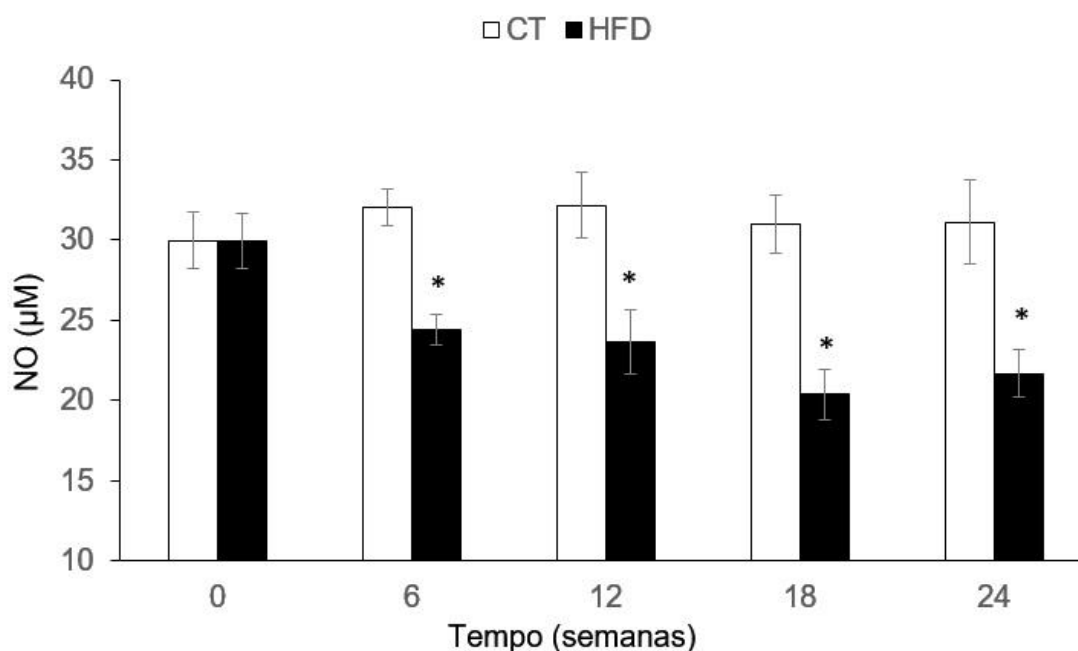


Resultados estão expressos em média \pm EPM (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD; + p<0.05, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas

4.6. Concentração sérica de Óxido Nítrico (NO) e peroxidação lipídica na Aorta

Através da quantificação no soro dos metabolitos do NO, podemos observar que os níveis de NO diminuem a partir de 6 semanas (CT: $32,04 \pm 1,12$; HFD: $24,44 \pm 0,93$; $p < 0,05$) e permanecem baixos durante 12 (CT: $32,16 \pm 2,03$; HFD: $23,67 \pm 2,01$; $p < 0,05$), 18 (CT: $31,00 \pm 1,76$; HFD: $20,37 \pm 1,57$; $p < 0,05$) e 24 (CT: $31,13 \pm 2,62$; HFD: $21,68 \pm 1,47$; $p < 0,05$) semanas quando comparado ao grupo controle. Nos animais alimentados com dieta padrão não houve diminuição na concentração de NO durante as 24 semanas. (Figura 24).

FIGURA 24. Concentração sérica de oxido nítrico em μM nos grupos CT e HFD

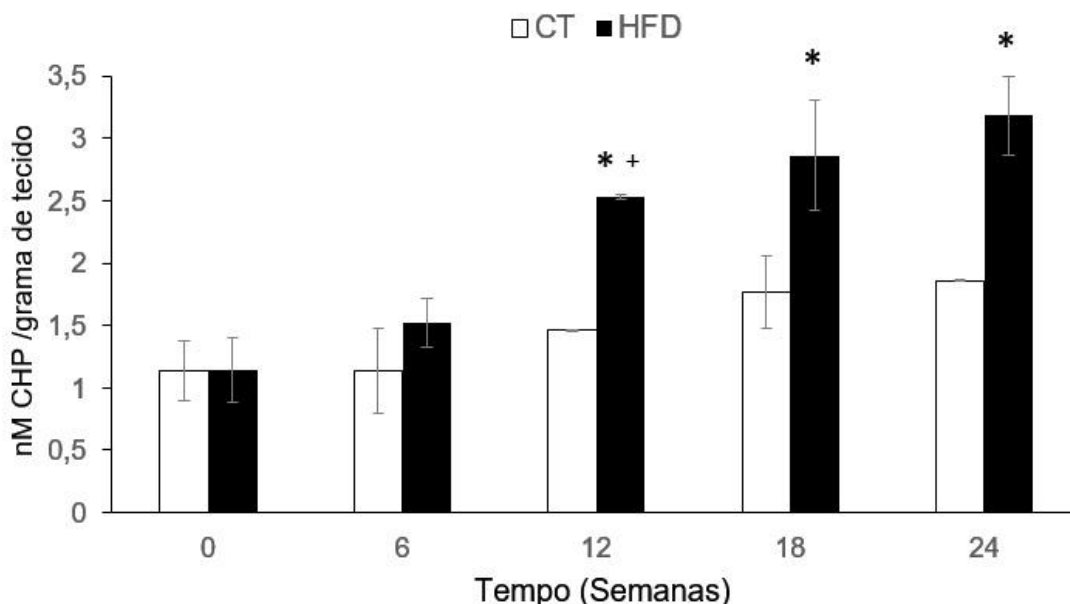


Resultados estão expressos em média \pm EPM ($n=7$). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. * $P < 0,05$, Grupo CT comparado o grupo HFD; + $p < 0,05$, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas

Em relação a peroxidação lipídica na aorta, podemos verificar que a partir da 12ª semana de tratamento houve aumento significativo deste processo nas aortas dos animais alimentados com HFD (CT: $1,46 \pm 0,34$; HFD: $2,53 \pm 0,2$; $p < 0,05$), permanecendo mais alto em 18 (CT: $1,77 \pm 0,29$; HFD: $2,86 \pm 0,44$; $p < 0,05$) e em 24 (CT: $1,86 \pm 0,01$; HFD: $3,18 \pm 0,32$; $p < 0,05$) semanas.

No grupo controle não houve aumento na peroxidação lipídica durante todo período experimental, enquanto que no grupo HFD houve aumento entre 6 semanas e 12 semanas (CT: $1,52 \pm 0,20$; CT: $2,53 \pm 0,02$; $p < 0,05$), (Figura 25).

FIGURA 25. Peroxidação lipídica em anéis aórticos dos grupos CT e HFD

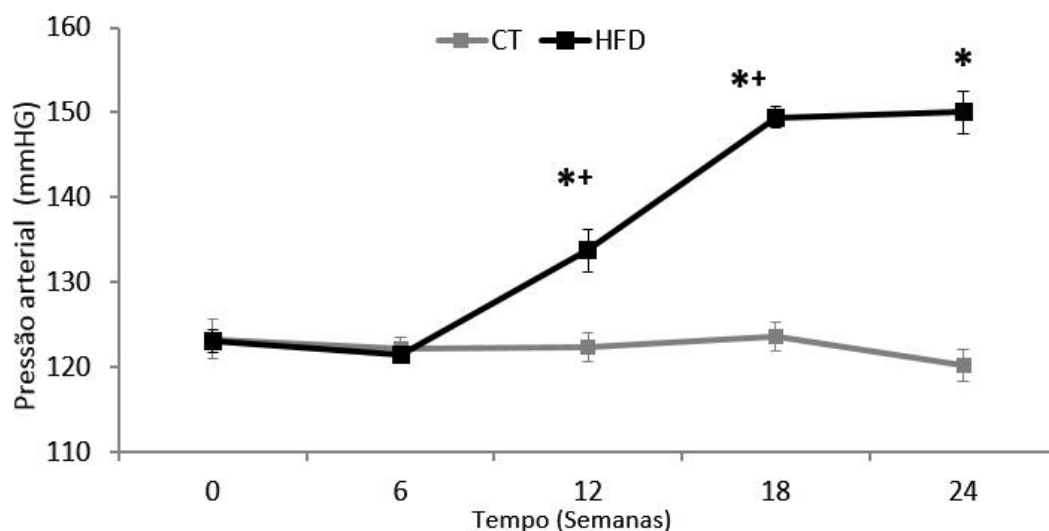


Resultados estão expressos em média \pm EPM ($n=7$). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. * $P < 0,05$, Grupo CT comparado o grupo HFD; + $p < 0,05$, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas

4.7. Mensuração da Pressão Arterial Sistólica

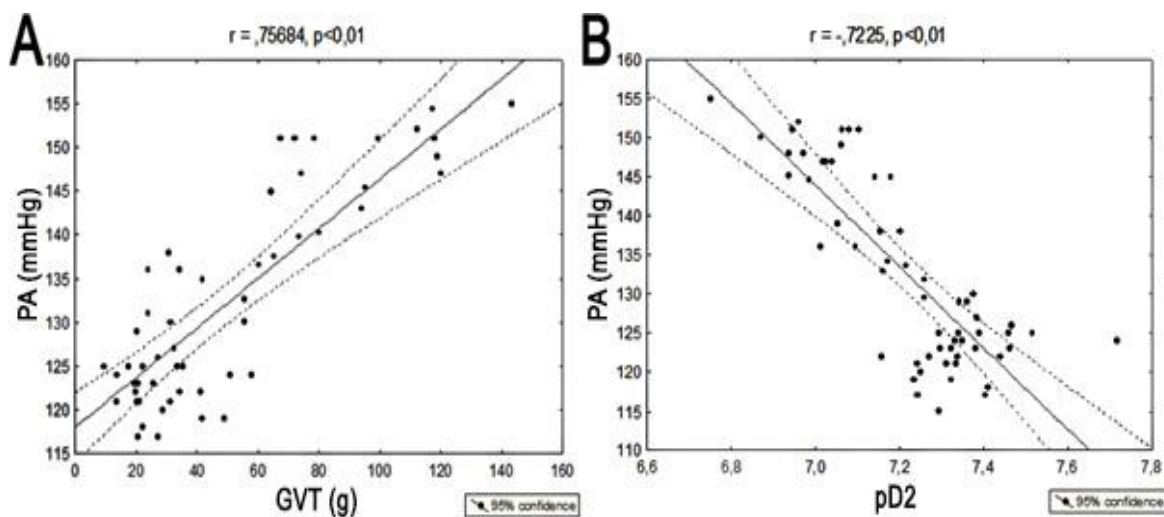
Como observado na Figura 26, a dieta hiperlipídica foi capaz de induzir o aumento da pressão arterial sistólica em 12 semanas (CT: 122; HFD: 133; $p < 0,05$), 18 semanas (CT: 123; HFD: 149; $p < 0,05$) e 24 semanas (CT: 120, HFD 150; $P < 0,05$) quando comparado ao respectivo grupo controle. No grupo HFD verificamos que a pressão se eleva até a 18ª semana (HFD 12 semanas: 122; HFD 18 semanas: 149; $p < 0,05$), onde se estabiliza até o fim do período experimental em 24 semanas. Além disso, encontramos uma forte correlação positiva entre a pressão arterial sistólica e GVT ($r=0,756$, $p < 0,01$), como também uma forte correlação negativa entre a pressão arterial sistólica e o pD2 ($r=-0,722$, $p < 0,01$).

FIGURA 26. Evolução na Pressão sanguínea dos grupos CT e HFD durante as 24 semanas de protocolo experimental.



Resultados estão expressos em média \pm EPM ($n = 7$). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. * $P < 0.05$, Grupo CT comparado o grupo HFD; + $p < 0.05$, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

FIGURA 27. Correlação entre (A) pressão arterial e gordura visceral total (GVT), e (B) correlação entre a pressão arterial e pD2 durante todo o período experimental



4.8. Análise Histológica da aorta

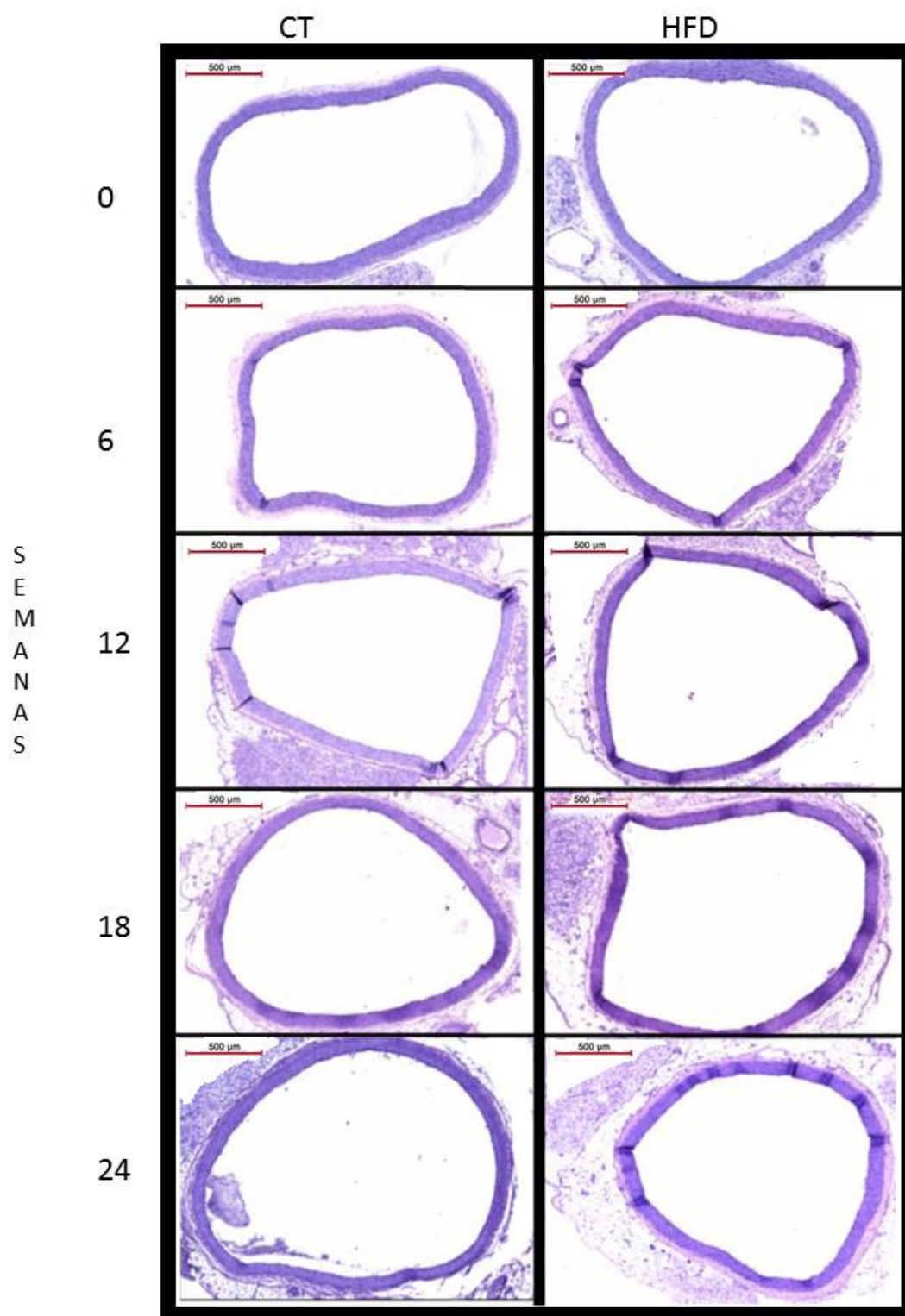
Em relação a espessura dos vasos, podemos verificar que nos animais do grupo HFD houve aumento a partir de 18 (CT: $161,05 \pm 3,35$; HFD: $178,20 \pm 1,98$; $p < 0,05$) e 24 (CT: $165,21 \pm 4,67$; HFD: $181,96 \pm 2,77$; $p < 0,05$) semanas de tratamento quando comparado aos valores do grupo CT. O diâmetro interno apresentou-se menor em apenas 24 semanas no grupo HFD quando comparado ao seu respectivo controle (CT: $3002,25 \pm 50,65$; HFD: $2835,53 \pm 42,53$; $p < 0,05$), (Tabela 3, figura 27).

TABELA 3. Espessura, Diâmetro interno (DI) em μm , e razão espessura do vaso/DI

	Espessura		Diâmetro interno (DI)		Razão espessura/DI	
	CT	HFD	CT	HFD	CT	HFD
0	$157,99 \pm 2,76$	$157,88 \pm 2,75$	$2830,64 \pm 25,58$	$2832,64 \pm 24,98$	$0,056 \pm 0,0$	$0,056 \pm 0,0$
6	$163,51 \pm 2,51$	$163,64 \pm 3,61$	$2967,21 \pm 58,29^+$	$2919,31 \pm 43,85$	$0,054 \pm 0,0$	$0,056 \pm 0,0$
12	$162,82 \pm 2,22$	$164,64 \pm 2,78$	$2976,80 \pm 55,91$	$2876,36 \pm 9,89^+$	$0,055 \pm 0,0$	$0,057 \pm 0,0$
18	$161,65 \pm 3,35$	$178,20 \pm 1,98^*+$	$2987,53 \pm 45,08$	$2854,40 \pm 50,42$	$0,054 \pm 0,0$	$0,062 \pm 0,0^*+$
24	$164,21 \pm 4,67$	$181,96 \pm 2,77^*$	$3002,25 \pm 50,65$	$2835,53 \pm 42,53^*$	$0,054 \pm 0,0$	$0,064 \pm 0,0^*$

Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. * $P < 0,05$, Grupo CT comparado o grupo HFD; + $p < 0,05$, comparação intra-grupo: 0 vs 6, 6 vs 12, 12 vs 18, 18 vs 24 semanas.

FIGURA 28. Imagem Histológica da artéria aorta, nos grupos CT e HFD em 0, 6, 12, 18 e 24 semanas.

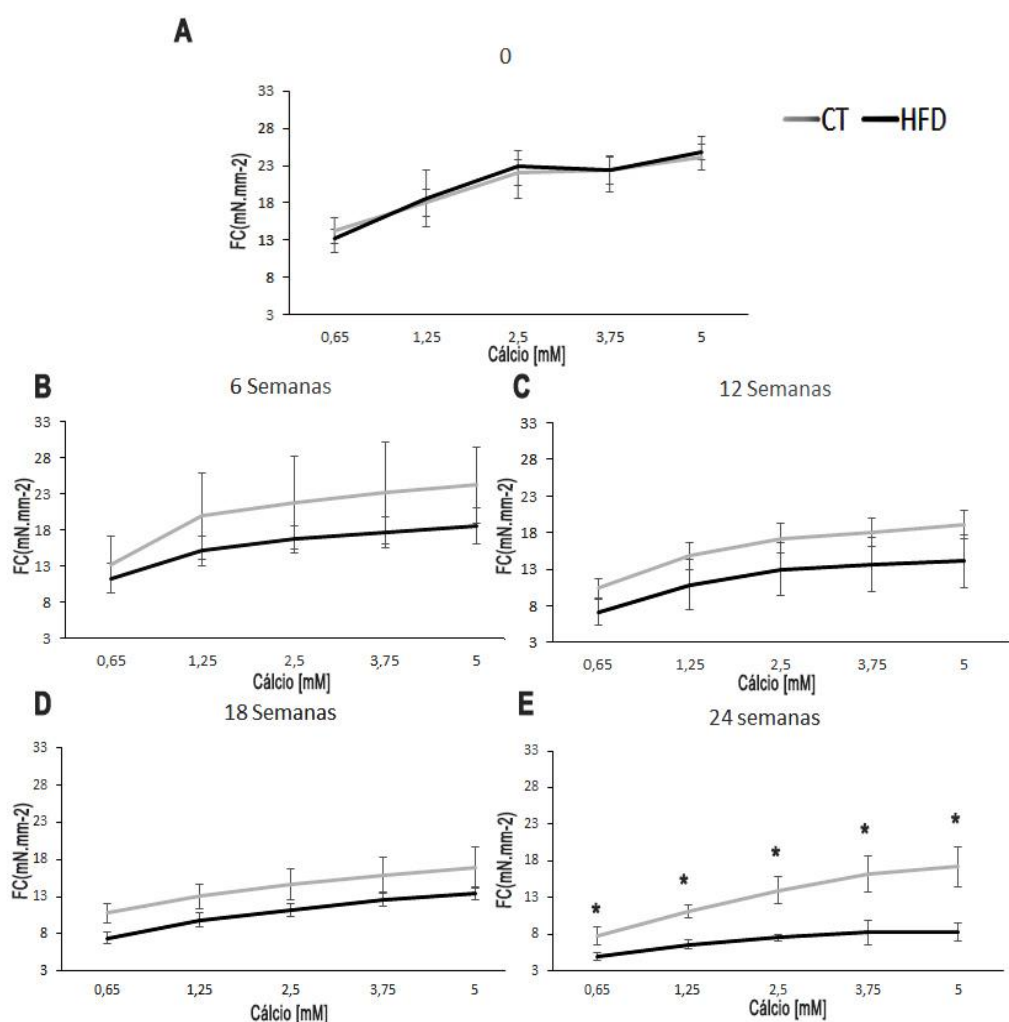


Cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) em objetiva de 40X.

4.9. Contratilidade do músculo cardíaco isolado.

Podemos observar na Figura 28, que a força contrátil de tiras musculares isoladas do ventrículo esquerdo. Com o aumento no cálcio extracelular é esperado uma resposta inotrópica positiva, a qual está atenuada em resposta a crescentes concentrações de cálcio no grupo HFD após 24 semanas de protocolo experimental. Não houve alterações nestes parâmetros nos tempos 0, 6 e 18 semanas.

FIGURA 29. Concentração efeito para o aumento de cálcio extracelular em tiras musculares isoladas do ventrículo esquerdo dos animais do grupo CT e HFD. (E).



(A), 6 semanas (B), 12 semanas (C), 18 semanas (D) e 24 semanas. Resultados estão expressos em média \pm EPM (n=7). Comparações foram realizadas usando o teste paramétrico ANOVA Two-way seguido do teste post-hoc Newman-Keuls. *P < 0.05, Grupo CT comparado o grupo HFD nas mesmas concentrações de cálcio.

5. DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados pode-se observar a importância de estudos relacionados à obesidade, uma vez que ela representa um dos fatores mais graves para o aparecimento de doenças cardiovasculares, e também está associada com o risco de desenvolvimento de Diabetes tipo II, dislipidemias entre outros.

Este estudo é um dos primeiros a demonstrar os efeitos do ganho de massa adiposa sobre a função cardiovascular, o status metabólico e inflamatório durante a instalação do quadro de obesidade. Conseguimos determinar com mais precisão a cinética do desenvolvimento da obesidade. Nossos achados mostraram que a inflamação crônica, a disfunção endotelial e a resistência à insulina são os primeiros problemas a aparecerem, e que a progressão da obesidade acarreta o aparecimento de severas condições patológicas.

A dieta hiperlipídica palatável usada neste estudo induziu o aumento da massa adiposa nos animais que a consumiram, validando nosso modelo experimental. A possibilidade de se desenvolver problemas associados à obesidade está diretamente relacionada ao grau de adiposidade (Gomez-Ambrosi et al., 2012), em particular, ao acúmulo de gordura na região visceral (Tchernof & Despres, 2013). Nesse estudo, no grupo HFD observamos que a partir de 6 semanas ocorre aumento de gordura visceral e que esta continuou a aumentar durante todo o protocolo experimental.

Quando foi descoberto que a obesidade leva ao estado inflamatório em tecidos metabolicamente ativos, um novo campo de pesquisa foi criado para compreender os mecanismos que levam a este estado. Estudos já demonstraram que o estado inflamatório induzido por excedente metabólico é distinto da inflamação clássica, definida por sinais como: vermelhidão, suor, calor e dor (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Na inflamação clássica, a resposta inflamatória inicia-se geralmente em resposta a um patógeno (molécula de um micróbio, parasitas, corpos estranhos ou tecido lesado) que levará a ativação da via de sinalização da resposta imune. Por outro lado, ainda não se sabe qual é o gatilho para o início do processo inflamatório gerado pelo excesso de alimentação em humanos ou pela dieta hiperlipídica (HFD) em animais. Uma hipótese é de que ela se origina em células especializadas como

os adipócitos, miócitos e hepatócitos. Estas células, mesmo que não sejam do sistema imune, possuem seus próprios mecanismos de defesa, sendo capazes de iniciarem a sinalização inflamatória em resposta aos sinais de perigo (Gregor e Hotamisligil, 2011). O adipócito pode executar a sinalização inflamatória ativando inflamassomos e receptores tipo Toll-like (TLR), sinalização de JNK (c-jun N-terminal kinase) e NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias em resposta a sinais de estresse metabólico que são normalmente associados às células imunes (Gregor e Hotamisligil, 2011).

Como descrito anteriormente, o tecido adiposo não é somente um órgão passivo armazenador de triacilgliceróis e fonte de ácidos graxos livres não esterificados (NEFAs). Os pré-adipócitos ao se tornarem adipócitos maduros adquirem a habilidade de secretar várias substâncias como as quimiocinas, citocinas e hormônios, atuando como órgão endócrino e parácrino, já que estas substâncias participam em diversos processos metabólicos (Van Gaal et al 2006).

Os adipócitos participam integralmente na inflamação induzida pela obesidade devido ao aumento da secreção de várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, incluindo a proteína quimiotática de monocitos (MCP-1), fator de necrose tumoral (TNF) - α , interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8. Além disso, a concentração de macrófagos no tecido adiposo é positivamente correlacionada com o tamanho do adipócito e da massa corporal, com a expressão de citocinas pró-inflamatórias, com o TNF- α (Jung & Choi, 2014).

A obesidade induz, além do aumento dos macrófagos no tecido adiposo, mudança no fenótipo destas células, de uma polarização anti-inflamatória M2 para um estado de polarização M1 pró-inflamatória. O acúmulo de macrófagos M1 no tecido adiposo resulta em aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a resistência à insulina (Jung e Choi, 2014). Desta maneira, o tecido adiposo é fundamental para o desenvolvimento da inflamação crônica de baixo grau, uma vez que este aumenta a secreção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como: Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e Interleucina (IL)-6, as quais estão associadas com a resistência à insulina e disfunção endotelial (Jung & Choi, 2014; Calai & Hostamisligil, 2013).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que contribui para o aparecimento de complicações relacionadas ao excesso de gordura. Em humanos obesos e com resistência à insulina ela é altamente expressa. A aplicação de TNF- α induz a

resistência à insulina em tecido adiposo saudável, enquanto que a sua inativação ou bloqueio de seus receptores melhoram a sensibilidade a insulina em animais obesos. Somando a isso, o TNF- α é parte de um sistema inflamatório complexo capaz de ativar a cascata de citocinas envolvendo reações que controlam a síntese e expressão de outras citocinas, hormônios e seus receptores (Jung e Choi, 2014). O TNF- α também contribui para a elevação da proteína C-reativa (PCR), a qual é um marcador de inflamação crônica de baixo grau, e possui íntima relação com coagulação, resistência à insulina, dislipidemia e disfunção endotelial (Van Gaal et al, 2006).

A IL-6 é outra citocina com importante papel no desenvolvimento da resistência à insulina na obesidade. Em humanos, os níveis circulantes de IL-6 variam entre 10 a 35% devido à ação do tecido adiposo e podem ter a sua produção aumentada com o crescimento dos adipócitos (Jung e Choi, 2014). Em camundongos, a dieta hiperlipídica induziu a elevação de IL-6 após 2, 4 e 6 meses (Barbosa da Silva, et al., 2012). Além disso, houve um aumento plasmático nos níveis de TNF- α , IL-6 após 15 semanas (Carvalho, et al., 2015). Em ratos, a dieta hiperlipídica aumentou a concentração de TNF- α e outros marcadores inflamatórios após 12 semanas (Kin et al., 2016).

Neste trabalho, observou-se que no grupo HFD, após 6 semanas, os níveis de adipocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e CRP aumentaram e permaneceram elevadas até o final do experimento. Por outro lado, no mesmo período, a concentração de adiponectina diminuiu e permaneceu em níveis baixos quando comparado ao grupo controle.

A adiponectina é uma adipocina que possui a capacidade de aumentar a sensibilidade a insulina, e por isso, seu nível fica baixo em pessoas obesas. Esse comportamento também foi observado em modelos animais (Jung e Choi, 2014).

Segundo os resultados obtidos neste trabalho, observou-se precoce instalação do quadro inflamatório de baixo grau nos ratos com excesso de peso, corroborando com os resultados da literatura. Contudo, esse estudo apresentou resultados inéditos, mostrando o início do processo inflamatório e possibilitou o seu acompanhamento ao longo de todo período experimental, diferente da literatura, que mostra caracterizações pontuais.

A obesidade está se tornando uma epidemia global observada em adultos e crianças e está aliada ao estilo de vida sedentário e alimentação inadequada, e

está associada a inúmeras doenças graves como doenças cardiovasculares, diabetes do tipo II, hipertensão, certos tipos de câncer (WHO report 2016).

A resistência à insulina é outra característica marcante da obesidade e da síndrome metabólica e um dos principais marcadores para o desenvolvimento de diabetes tipo II (Jung & Choi, 2014). O teste de tolerância à insulina (ITT) determina a sensibilidade dos receptores de insulina nos tecidos pela mensuração da taxa de decréscimo de glicose sanguínea antes e após a sua administração (Bonora et al., 1989). Esta queda exibe uma curva e a área embaixo da curva (AUC) é usada como indicador da sensibilidade a insulina. Quanto maior a AUC, menor é a sensibilidade à insulina. Foi observado no grupo HFD um decréscimo na sensibilidade a insulina em apenas 6 semanas de tratamento que se estabilizou até a 12^a semana. Após esse período, a sensibilidade à insulina começa a cair de maneira significativa até o final do experimento. Esta diminuição na sensibilidade à insulina em 6 semanas coincidiu com o aumento nos níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α associadas a resistência à insulina e diabetes (Nieto-Vasquez et al., 2008; Hotamisligil et al., 1995).

O TNF- α foi a primeira citocina que teve seu envolvimento relacionado à resposta inflamatória sistêmica. Observou-se nos tecidos adiposos de camundongos obesos quando comparado com controles magros que seus níveis estavam aumentados (Hotamisligil et al., 2005). Em humanos obesos o nível de TNF- α também aumenta e é correlacionado com a resistência à insulina (Hotamisligil et al., 1994).

Na literatura existem registrados inúmeros efeitos descritos para a função da adiponectina como: capaz de aumentar a sensibilidade à insulina, de melhorar as funções cardiovasculares e de possuir efeitos anti-inflamatórios (Li et al., 2010; Dolores Prieto et al., 2014; Jung & Choi., 2014). Neste trabalho, no grupo HFD, observou-se a diminuição das concentrações séricas de adiponectina após 6 semanas de protocolo experimental, embora, não estatisticamente diferente, a adiponectina continua diminuindo durante todo período experimental.

Desta forma, pode-se relacionar a baixa sensibilidade à insulina apresentada pelos animais do grupo HFD ao aumento do TNF- α e IL-6 e ao decréscimo dos níveis de adiponectina.

O endotélio é uma monocamada celular que envolve o interior dos vasos sanguíneos e atua como interface entre a circulação sanguínea e a parede

vascular. O endotélio também atua como órgão endócrino e paracrino que regula a função vascular secretando uma variedade de fatores tróficos e vasoativos que regulam tônus vascular, a adesão celular, a proliferação de células musculares lisas e a inflamação da parede vascular (Chantemele, 2012). A obesidade também está associada a função endotelial prejudicada e como já mencionado, promove uma gama de desordens metabólicas como o acúmulo de tecido adiposo, a elevação da pressão sanguínea, a dislipidemia e o diabetes, também associado ao estresse oxidativo (Avogaro & Kreutzenberg 2005; Van Gaal et al., 2006). Na obesidade muitos fatores podem afetar negativamente a função endotelial, como mudanças na pressão sanguínea, nível de glicose, metabolismo lipídico e sistema inflamatório (Stapleton et al., 2008; Bray, 2004; Avogaro & Kreutzenberg, 2005). Essa associação pode acontecer através de mecanismos indiretos (resistência à insulina, diabetes, hipertensão e dislipidemia (Bakker et al., 2009) ou mecanismos diretos, como a produção de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, níveis elevados de ácidos graxos livres e estresse oxidativo, que por sua vez, causa a redução da disponibilidade de NO (De Kreutzenberg et al., 2000; Virdis et al., 2011).

Diversos estudos mostram que a obesidade prejudica a função endotelial em diferentes tempos experimentais durante o seu desenvolvimento. Por exemplo, Boustany-Kari et al., (2007) observou que em 11 semanas a ingestão de alimentos calóricos piorou a função endotelial de ratos, Boa et al., (2014) verificou piora na função endotelial após 20 semanas em ramsters. Após 16 semanas de ingestão de HFD, além de se observar a disfunção endotelial houve o aumento da pressão sanguínea em camundongos (Kobayasi et al., 2010; Costa et al., 2011].

No presente estudo, verificou-se que 6 semanas de nutrição com a dieta HFD foram suficientes para induzir disfunção endotelial. Verificada através da piora no relaxamento induzido por acetilcolina nos anéis aórticos dos animais no início do desenvolvimento da obesidade. Esse fato pode estar associado à redução na produção ou biodisponibilidade de óxido nítrico, onde verificamos diminuição em sua concentração sérica após 6 semanas de estudo. Zechin et al., (2007) verificou menor níveis teciduais de eNos em aorta de animais submetidos a HDF após 60 dias. Desta forma, pode-se hipotetizar que esta disfunção encontrada precocemente após 40 dias é decorrente da diminuição nos níveis circulantes de NO devido a menor produção via eNOS.

A disfunção endotelial caracterizada pelo relaxamento do endotélio prejudicado pode ocorrer devido a vários fatores como: diminuição na expressão da eNOS; diminuição na atividade antioxidante; aumento da inflamação vascular via NF- κ B (Davel et al.,2011); down-regulation na via PI3K–Akt–eNOS; (Fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K)-AKT/proteína quinase B (PKB)) e diminuição na disponibilidade de NO (Garcia-Pietro et al.,2015).

A adiponectina pode modular a produção de NO através da fosforilação da Serina 1177 aumentando a produção de NO. Por outro lado, IL-6 e TNF- α diminuem a fosforilação de Serina 1177 na eNOS resultando na diminuição de sua atividade e conseguinte menor produção de NO (Dolores Prieto et al., 2014). Além disso, TNF- α diminui a vasodilatação em artérias de resistência em ratos e seus níveis são fortemente associados com a adiposidade (Stapleton et al., 2008). Por outro lado, a diminuição dos níveis de adiponectina está associada com dislipidemia e doenças cardiovasculares. A adiponectina estimula a oxidação de ácidos graxos e glicose através da ativação de AMPK (proteína quinase ativada por AMP) no fígado e musculo esquelético. Também está associada a vários efeitos positivos no metabolismo de lipoproteínas como também sobre a sensibilidade a insulina (Jung & Choi., 2014).

Nossos resultados corroboram com aqueles apresentados pela literatura. Após 6 semanas de HFD conseguimos observar o aumento significativo de massa corporal e de gordura visceral total, aumento dos níveis circulantes das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e PCR, além da diminuição do nível de adiponectina circulante. Desta maneira, nossos resultados confirmam o conceito de obesidade ligada a disfunção endotelial, e que estes eventos ocorrem precocemente durante o desenvolvimento da obesidade, e corroborando com estes resultados, interessante correlação negativa entre a gordura visceral total e função endotelial foi verificada. Neste contexto, a hipertensão é caracterizada pela alta pressão sanguínea de maneira crônica de origem multifatorial, e a disfunção endotelial dos vasos sanguíneos pode contribuir para a gênese e manutenção da hipertensão (Davel et al., 2014). Além disso, a disfunção endotelial é uma característica presente na hipertensão que está fortemente associada a obesidade. A hipertensão é um dos fatores de risco que está mais fortemente associado a probabilidade de se desenvolver doenças cardíacas, sendo que 79% dos casos de

hipertensão em homens e 65% dos casos em mulheres são resultado direto do excesso de peso (Garrison et al., 1987).

Em nosso estudo, podemos verificar que a HFD induziu elevação da pressão sanguínea na 12^a semana e que continuou a aumentar até a 18^a semana. Estes resultados estão coerentes aos resultados de trabalhos realizados por outros grupos. Por exemplo, Boustany et al., (2012), observou aumento da pressão sanguínea e aumento da atividade no sistema renina-angiotensina no tecido adiposo após 11 semanas de HFD em ratos. Yiannikouris et al., (2012) verificou em camundongos alimentados pela HFD o aumento na pressão sanguínea e nos níveis de angiotensina II após 16 semanas.

O Estudo do Coração de Framingham, envolveu mais de 4 mil homens e mulheres por oito anos e encontrou íntima relação entre a quantidade de gordura corporal e pressão sanguínea nos dois grupos. A adiposidade apareceu como maior fator controlável associado à hipertensão (Garrison et al., 1987), igualmente encontrado nesse estudo em que se observou forte correlação positiva entre a GVT e pressão sanguínea.

Estudos prévios sugerem que a hipertensão esteja associada com aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) em todas as camadas da parede vascular (Schulz et al., 2011; Rodrigues et al., 2012). Em concordância com estes estudos, os resultados obtidos neste trabalho mostraram aumento na peroxidação lipídica na aorta dos animais obesos ao mesmo tempo em que houve aumento na pressão sanguínea, em 12 semanas. Kobayasi et al., (2010) observou em camundongos após 16 semanas de HFD, que ocorre diminuição na defesa antioxidante e o aumento na inflamação vascular e relaxamento dependente do endotélio foi prejudicado. A liberação de IL-6 dos adipócitos abdominais possui papel chave na relação entre estresse oxidativo e disfunção endotelial. IL-6 e TNF- α contribuem para a elevação de PCR, o qual é um marcador da inflamação crônica de baixo grau que também possui íntima relação com a coagulação, resistência à insulina, dislipidemia e disfunção endotelial (Van Gaal et al., 2006). TNF- α também está envolvido na indução de geração de EROS e inibição da eNOS (Zang et al., 2009).

Como já mencionado, a obesidade é comumente associada com estresse oxidativo (Vincent et al., 2007), que representa um desequilíbrio entre EROS e as defesas antioxidantes. O resultado dessa complexa interação é o aumento no

processo oxidativo que leva a danos teciduais, sendo um dos principais mecanismos subjacente as comorbidades associadas à obesidade (Fernández-Sánchez et al., 2011).

O estresse oxidativo é capaz de modificar o tônus vascular pela diminuição na biodisponibilidade de NO, pois ocorre produção excessiva de O_2^- e EROS, que rapidamente oxidam o NO tornando-o inativo (Förstermann, 2010). Neste estudo, verificou-se que após 6 semanas, nos animais que foram tratados com a HFD houve diminuição nos níveis de NO circulante sem alterações significativas na peroxidação lipídica na aorta. Desta maneira, temos forte indicação de que a diminuição nos níveis de NO precedem o aumento no estresse oxidativo, nesse estágio do desenvolvimento da obesidade.

O estresse oxidativo é um dos principais responsáveis pelos danos causados nos tecidos e está ligado a vários processos patológicos. A produção excessiva de EROS, que suplanta os mecanismos de defesa antioxidantes, é a responsável pela oxidação de macromoléculas biológicas, como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (Cai e Harrinson, 2000). Eles podem atacar os lipídios insaturados das membranas celulares levando a perda da seletividade na troca de íons, mudanças na permeabilidade e comprometimento dos componentes da matriz extracelular. A peroxidação lipídica é o processo de reação em cadeia que envolve a participação de radicais livres, capaz de induzir alterações em diversas funções celulares. Com isso a peroxidação lipídica é frequentemente usada como marcador do estresse oxidativo (Victor et al., 2009; Rodrigo e Paoletto, 2011; Vaca et al., 1988; Halliwell e Gutteridge, 1986).

De acordo com Victor et al. (2007), enquanto os estoques de gordura expandem, os adipócitos aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, as HFD reduzem a expressão de genes envolvidos no sequestro de radicais livres (enzimas antioxidantes superóxido dismutase 1 e 2, Glutathione peroxidase). Neste trabalho, observou-se crescente aumento de gordura visceral que pode ser relacionado a peroxidação lipídica encontrada nas aortas dos animais tratados com HFD.

A dieta hiperlipídica também pode induzir a patogênese vascular, incluindo efeitos sobre a artéria aorta acarretando alterações na estrutura vascular, estudos clínicos e experimentais demonstraram que o aumento do IMC está frequentemente

associado ao enrijecimento e aumento na espessura da parede arterial (Martinez-Martinez et al., 2013).

A hipertensão essencial está associada com a diminuição do lúmem interno e aumento na espessura da túnica média, com conseqüente aumento na razão diâmetro interno/espessura, decorrente de um remodelamento eutrófico (rearranjo de material vascular para dentro do lúmem, diminuindo seu diâmetro) ou hipertrófico (hipertrofia ou hiperplasia das células musculares lisas), (De Ciuceis et al., 2011).

O aumento na razão DI/espessura é um poderoso preditor de eventos cardiovasculares em pessoas com hipertensão (De Ciuceis et al., 2007), em nosso estudo essa razão apesar de não significativa, começa a aumentar em 12 semanas, coincidindo com a elevação da pressão sanguínea, e em 18 e 24 semanas este aumento se torna significativo. Chen et al., (2016), verificou que a HFD induziu aumento na espessura da túnica média, como também aumento de TNF- α em 3 e 6 meses na aorta, considerando que a inflamação é geralmente acompanhada de stress oxidativo, também houve aumento nas proteínas oxidadas e nitroziladas. Dados similares foram encontrados em nosso estudo, onde verificou-se alteração no perfil inflamatório sistêmico em 6 semanas, seguido de aumento no estresse oxidativo no mesmo período encontrado por Chen et al., (2016) em 12 semanas, como aumento na espessura da túnica media em 18 semanas.

O remodelamento vascular é uma resposta adaptativa frente a elevação da pressão arterial (Arribas et al., 2006), fato comprovado em nosso estudo, pois verificamos que esse remodelamento ocorreu de fato após a elevação da pressão arterial em 12 semanas.

A piora na função contrátil cardíaca também está presente na obesidade em humanos ou em modelos experimentais, tanto quando mensurada no coração inteiro como em miócitos ou tiras ventriculares isoladas (Relling et al., 2006). O excesso de nutrientes, como mimetizado nas dietas hiperlipídicas esta associado a anormalidades no miocárdio (Ko et al., 2009), e a inflamação crônica eleva potencialmente os riscos de desenvolver insuficiência cardíaca (Yndestad, et al., 2006), em nosso estudo verificamos que essa inflamação de baixo grau se inicia precocemente com o uso da dieta.

O significativo aumento dos níveis de triglicerídeos nos tecidos também induz a depressão na contração cardíaca e apoptose através da disfunção cardíaca

em decorrência de lipotoxicidade (Zou et al., 2000). Em nosso estudo observamos o aumento nos níveis de triglicérides no grupo HFD em 12 semanas, e a diminuição na força de contração apenas em 24 semanas, enquanto que Relling et al., (2006) verificou que a dieta hiperlipídica resultou na piora da função contrátil do miocárdio após 12 semanas de tratamento em ratos. O percentual de lipídios da dieta utilizada por Relling et al., (2006) foi de 45%, enquanto neste estudo foi utilizada dieta com percentual de lipídeos de aproximadamente 25%, o que pode explicar a diminuição na força de contração surgir com menos semanas de HFD.

Desta maneira, podemos verificar que dieta hiperlipídica ofertada durante 24 semanas neste estudo, induz a inflamação crônica, disfunção endotelial, resistência à insulina, hipertensão, que por sua vez contribuem para a disfunção contrátil cardíaca encontrada ao final do estudo.

6. CONCLUSÃO

A inflamação crônica, a resistência à insulina e a disfunção endotelial iniciam-se precocemente a partir de seis semanas de indução da obesidade, refletindo que apenas um curto período de consumo da dieta é capaz de produzir alterações metabólicas importantes.

O aumento no tempo de exposição e alimentação com dieta hiperlipídica, leva ao agravamento do quadro metabólico, como também o aumento na pressão arterial e culminando com alterações na contratilidade cardíaca.

Foi demonstrado de forma inédita o *time-course* (cinética das alterações deletérias decorrente da obesidade) do status inflamatório, desordens metabólicas, e alterações na contratilidade cardíaca durante o desenvolvimento da obesidade. Portanto tais dados reforçam a importância de intervenções, como mudanças nos hábitos alimentares, alterações do estilo de vida sedentário para um mais ativo, de modo a prevenir o aumento prejudicial de tecido adiposo de modo a evitar o surgimento destas alterações deletérias associadas a obesidade.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abdellaoui A, Al-Khaffaf H. (2007) C-reactive protein (CRP) as a marker in peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, ;20:1-5

Adamczak M, Wiecek, A. (2013) The adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Seminars in Nephrology*, 33, 2-13.

Alan I, Ng TP, Larbi, A. (2012) Does inflammation Determine Whether obesity is metabolically health or unhealthy? The aging perspective. *Mediators of Inflammation*, Article ID 456456, 14 pages doi:10.1155/2012/456456

Albert MA, Glynn RJ, Ridker PM. (2003) Plasma concentration of C-reactive protein and the calculated Framingham Coronary Heart Disease Risk Score. *Circulation*, 108: 161.

Allison DB, Downey M, Atkinson RL, Billington CJ., Bray GA, Eckel RH, Finkelstein EA, Jensen MD, Tremblay A. (2008) Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the council of the obesity society. *Obesity*, 16(6):1161-1177.

Anderson MS, Thamocharan M, Kao D, Devaskar SU, Qiao L, Friedman JE, Hay WW Jr. (2005). Effects of acute hyperinsulinemia on insulin signal transduction and glucose transporters in ovine fetal skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*,Feb;288(2):R473-81. Epub 2004 Nov 11.

Aprahamian TR, Sam F (2011). Adiponectin in Cardiovascular Inflammation and Obesity *International Journal of Inflammation*, Article ID 376909, 8 pages doi:10.4061/2011/376909.

Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. (2006) Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* 2006;111:771–91.

Avogaro A, de Kreutzenberg S. V. (2005) Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta*, 360:9–26.

Avogaro A, de Kreutzenberg SV (2005) Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta* 360(1–2):9–26

Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. (2009) Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res*, 335(1): 165-89.

Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB.(2021) Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One*. 7(7):e39837. doi: 10.1371/journal.pone.0039837. Epub 2012 Jul 25.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B.(2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance *Eur. Cytokine Netw*, Vol. 17 n° 1, March, 4-12

Bastard JP, Maachi M, Tran Van Nhieu J, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B. (2002) Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2084.

Bays H.E. (2009) “Sick fat,” metabolic disease, and atherosclerosis. *Am J Med*, 122(1 Suppl):S26-37.

Beleigoli AM, Boersma E, Diniz FH, Lima-Costa MF, Ribeiro AL. (2012) Overweight and Class I Obesity Are Associated with Lower 10-Year Risk of Mortality in Brazilian Older Adults: The Bambui Cohort Study of Ageing. *PLoS ONE*, 7(12): e52111. doi:10.1371/journal.pone.0052111.

Beleigoli AM, Boersma E, Diniz MDE, Lima-Costa MF, Ribeiro AL. (2012) Overweight and class I obesity are associated with lower 10-year risk of mortality in

Brazilian older adults: the Bambuí Cohort Study of Ageing. *PLoS One*, 7 (12):e52111. doi: 10.1371/journal.pone.0052111. Epub. Dec 14.

Bluher M, Rudich A, Kloting N, Golan R, Henkin Y, Rubin E, Schwarzfuchs D, Gepner Y, Stampfer MJ, Fiedler M, Thiery J, Stumvoll M, Shai I.(2012) Two patterns of adipokine and other bio- marker dynamics in a long-term weight loss intervention. *Diabetes Care*, 35:342-9.

Bluher M. (2009) Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 117:241-50.

Bluher M. (2010) Do adipokines link obesity to its related metabolic and cardiovascular diseases? *Clin Lipidol*, 5:95-107.

Boa BCS, Souza MGC, Leite RD, Silva SV, Barja-Fidalgo TC, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E. (2014) Chronic Aerobic Exercise Associated to Dietary Modification Improve Endothelial Function and eNOS Expression in High Fat Fed Hamsters. *PLoS ONE*, (10): e1111158. doi: 10.1371/journal.pone.0111158

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A: Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:168–175, 2003.

Bonora E, Moghetti P, Zaccaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M. (1989) Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 68(2):374

Boustany CN, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA.(2012) Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Hypertension*, 60:1524-1530.

Boustany-Kary CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. (2007) Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *International Journal of Obesity*, 31, 1652–1659.

Bradley RL, Jeon JY, Liu FF, Maratos-Flier E (2008) Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(3):E586–94.

Bray GA. Medical consequence of obesity. (2004) *J Clin Endocrinol Metab*, 89:2583–2589.

Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 2282–2289.

Burgos-Ramos E, Chowen JA., Arilla-Ferreiro E, Canelles S, Argente J, Barrios V. (2011) Chronic central leptin infusion modifies the response to acute central insulin injection by reducing the interaction of the insulin receptor with IRS2 and increasing its association with SOCS3. *J Neurochem*. 2011, 117: 175–185.

Cai H, Harrinson G. (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The role of oxidant Stress. *Circulation Research*, 87: 840-844 doi: 10.1161/01.RES.87.10.840

Calay ES, Hotamisligil GS. (2013) Turning off the inflammatory, but not the metabolic, flames. *Nat Med*, Mar;19(3):265-7. doi: 10.1038/nm.3114. .PMID: 23467233

Cancello R, Henegar C, Viguierie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. (2005) Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54: 2277–2286.

Carvalho KM, Marinho Filho JD, de Melo TS, Araújo AJ, Quetz Jda S, da Cunha Mdo P, de Melo KM, da Silva AA, Tomé AR, Havt A, Fonseca SG, Brito GA, Chaves MH, Rao VS, Santos FA. (2015) The Resin from *Protium heptaphyllum* Prevents High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice: Scientific Evidence and Potential

Mechanisms. Evid Based Complement Alternat Med. 2015:106157. doi: 10.1155/2015/106157 Epub 2015 Jan 29.

Cermak, J, Key N, Bach R, Balla J, Jacob H, Vercellotti G. (1993) C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood*, 82:513–520.

Chantemele EJ, Stepp DW.(2012) Influence of obesity and metabolic dysfunction on the endothelial control in the coronary circulation. *Mol Cell Cardiol*, April; 52(4): 840–847. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.018

Chen J, Wang S, Luo M, Zhang Z, Dai X, Kong M, Cai L, Wang Y, Shi B, Tan Y. (2016) Zinc deficiency worsens and supplementation prevents high-fat diet induced vascular inflammation, oxidative stress, and pathological remodeling. *Toxicol Sci*. Jun 30. pii: kfw110. [Epub ahead of print]

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*, 46: 2347–2355.

Costa RRS, Villela NR, Souza MGC, Boa BCS, Cyrino FZGA, Silva SV, Lisboa PC, Moura EG, Barja-Fidalgo TC, Bouskela, E.(2011) High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvascular Research*, 82:416–422.

Coussens, L.M.& Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420, 860–867.
Cruz NG, Sousa LP, Sousa MO, Pietrani NT, Fernandes AP, Gomes B. (2012) The linkage between inflammation and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.*, Dec 13. pii: S0168-8227(12)00307-5. doi: 10.1016/j.diabres.2012.09.003.

Dâmaso, A. R. (1996) Efeitos do exercício agudo e crônico sobre o metabolismo lipídico e a celularidade adiposa de ratas durante a lactação e 48 horas após o desmame. Tese de Doutorado, Unifesp-Epm, São Paulo.

Das U.N.(2002) Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp Biol Med* (Maywood), 227: 989.

Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto, GK, Oliveira HT, Rossoni LV. (2011) Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(9).

De Ciuceis C, Porter E, Rizzoni D, Corbellini C, La Boria E, Boari GE, Pilu A, Mittempergher F, Di Betta E, Casella C, Nascimbeni R, Rosei CA, Ruggeri G, Caimi L, Rosei EA. (2011) Effects of weight loss on structural and functional alterations of subcutaneous small arteries in obese patients. *Hypertension*. Jul;58(1):29-36

De Kreutzenberg SV, Crepaldi C, Marchetto S, Calò L, Tiengo A, Del Prato S, Avogaro. (2000) Plasma free fatty acids and endothelium-dependent vasodilation: effect of chain-length and cyclooxygenase inhibition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(2): 793-8.

De Mey JG, Vanhoutte PM. (1982) Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res* 1982;51: 439–447.
Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats.

Department of Health (2011) Start active, stay active: A report on physical activity for health from the four home countries' Chief Medical Officers Diabetes. 2007 Apr;56(4):1014-24. Epub 2007 Jan 17.

Doyle SL, Donohoe, CL, Lysaght J, Reynolds JV. (2012) Obesity-related cancers Visceral obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and cancer. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71, 181–18

Duarte FO, Sene-Fiorese M, Cheik NC, Maria AS, de Aquino AE Jr, Oishi JC, Rossi EA, Garcia de Oliveira Duarte AC, Dâmaso AR. (2012) Food restriction and refeeding induces changes in lipid pathways and fat deposition in the adipose and

hepatic tissues in rats with diet-induced obesity. *Exp Physiol.* Jul;97(7):882-94. doi: 10.1113/expphysiol.2011.064121. Epub 2012 Mar 30

Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling (2013). *Front Immunol*; 4: 111.

Eikelis N, Schlaich M, Aggarwal A, Kaye D, Esler M. (2003) Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension*, 41:1072–9.

Erin E., Kershaw and Jeffrey S. (2004) Flier. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; vol. 89 , doi no. 6 2548-2556 :10.1210/jc.2004-0395

Esposito K., Pontillo A., Giugliano F., Giugliano G., Marfella R., Nicoletti G., and Giugliano D. (2003) Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 1055-1058.

Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. (2004) Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, 20(2):218–24.

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

Fasshauer M. & Paschke R. Regulation of adipo- cytokines and insulin resistance. *Diabetologia*, 2003, 46, 1594–1603.

Fellmann L, Nascimento AR, Tibiriça E & Bousquet P. (2013) Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics* 137 331–340. (doi:10.1016/j.pharmthera.2012.11.004)

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JÁ. (2011) Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity.

International Journal of Molecular Sciences, 12(5):3117-3132.
doi:10.3390/ijms12053117.

Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Inflammation and microalbuminuria in nondiabetic and type 2 diabetic subjects: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Kidney Int.* Oct;58(4):1703-10, 2000.

Fichtlscherer S, Breuer S, Zeiher AM: Prognostic value of systemic endothelial dysfunction in patients with acute coronary syndromes: further evidence for the existence of the "vulnerable" patient. *Circulation* 2004, 110:1926–1932.

Field AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird MA, Dietz WH, Rimm E, Colditz GA. (2001) Arch Impact of Overweight on the risk of Developing Common Chronic Diseases During a 10 year Period, *Intern* 2001; 161:158-1586.

Fisher M., Trujillo M.E., Hanif W., Barnett A.H., McTernan P.G., Scherer P.E, et al. Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia*. 2005;48: 1084-7.

Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager M, Deanfield J, Ganz P, Hamburg N, Luscher TF, Shechter M, Taddei S, Vita JA, Lerman A. (2012) The Assessment of Endothelial Function – From Research into Clinical Practice. *Circulation*. August 7; 126(6): 753–767.
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.093245.

Flier, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004, 116:337-350.

Fonseca-Alaniz M.H., Takada J., Alonso-Vale M.I.C. Lima F.B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006, vol 50 nº 2 Abril.

Ford E.S. The metabolic syndrome and C-reactive protein, fibrinogen, and leukocyte count: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2003; 168: 351.

Förstermann, U. (2010) Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 459:923–939, doi: 10.1007/s00424-010-0808-2.

Fried SK, Bunkin DA. (1998) Greenberg A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 847.

Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*, 3: 2007–201

Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288: 373–376.

Furchgott, RF. (1983). "Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle." *Circulation Research* 53(5): 557-573.

Galic S., Oakhill J.S., Steinberg G.R (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*,316:129-39.

García-Prieto CF, Hernández-Nuño F, Rio DD, Ruiz-Hurtado G, Aránguez I, Ruiz-Gayo M, Somoza B, Fernández-Alfonso MS. (2015) High-fat diet induces endothelial dysfunction through a down-regulation of the endothelial AMPK–PI3K–Akt–eNOS pathway. *Mol Nutr Food Res*, Mar;59(3):520-32. doi: 10.1002/mnfr.201400539. Epub 2014 Dec 22.

Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J 3rd, Castelli WP. (1987) Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham offspring study. *Prev Med*, 16:235–51.

Ghost, S., Golbidi, S., Wernier, I., Verchere, B. C., Laher, .I., Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview. *Clinical Science*. 2010; 119, 57–74.

Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ., Lindley M., Mastana SS, Nimmo MA. (2011) The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for prevention and treatment of disease. *Nature*, doi: 10.1038/nri3041.

Gomez-Ambrosi J, Silva C, Galofre JC, et al.(2012) Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *Int J Obes (Lond)*;36:286–294.

Grassi G, Seravalle G, Scopelliti F, Dell’Oro R, Fattori L, et al. (2010) Structural and functional alterations of subcutaneous small resistance arteries in severe human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 18: 92–98

Gregor MF, Hotamisligil GS. (2011) Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29:415-445.

Guimarães DED, Sardinha FLC., Mizurini DM, Carmo MGT (2007) Adipokines: a new view of adipose tissue. *Rev. Nutr*, vol.20 no.5 Campinas Sept./Oct.

Gutierrez DA, , Puglisi MJ, Alyssa HA. (2009) Hasty Impact of Increased Adipose Tissue Mass on Inflammation, Insulin Resistance, and Dyslipidemia, *Curr Diab Rep*, February ; 9(1): 26–32.

Hajer GR, Haefte TWV, Visseren FLJ. (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 2008 29, 2959–2971 doi:10.1093/eurheartj/ehn387.

Halberg N, Wernstedt-Asterhol,, I, Scherer, PE (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 2008, 37, 753–768.

Hall J.E., Silva A.A., Do Carmo J.M., Dubinion J., Hamza S., Munusamy S., Smith G., Stec D.E. Obesity-induced Hypertension: Role of Sympathetic Nervous System, Leptin, and Melanocortins. *J. Biol. Chem.* 2010, 285:17271-17276, doi: 10.1074/jbc.R110.113175 originally published online March 26, 2010

Halliwell B, Gutteridge JMC. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*;246:501-14.

Hansen D, Dendale P., Berger J., Van Loon LJ, Meeusen R. (2007) The effects of exercise training on fat-mass loss in obese patients during energy intake restriction. *Sports Med*, 37(1):31-46, <http://dx.doi.org/10.2165/00007256-200737010-00003>.

Hauner, H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 2005, 64, 163–169.

Heistad DD, Lopez JA, Baumbach GL (1991). Hemodynamic determinants of vascular changes in hypertension and atherosclerosis. *Hypertension*, 17(4 Suppl): III7-11

Herme-Lima M, Wilmore W, Storey KB. (1995) Quantification of peroxides in animal tissues based on Fe (II)-xylenol orange formation. *Free. Rad. Biol. Med.* V. 19, p.271-280.

Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87–91. [PubMed]

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:2409-2415.

Hotamisligil, GS. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444, 860–867.

Huang P. (2009) eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab* 2009; Aug; 20(6): 295–302.

Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, Tesauro M. (2014) Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents*. Apr-Jun;28(2):169-76. Review.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)
http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1 ISBN 978 92 4 156525 7 (NLM classification: WK 810)

Jiang ZY, Hunt JV, Wolf, SP. (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. *Anal. Biochem.*, v202, p 384-389.

Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff S. (1991) Lipid hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe²⁺ in the presence of Xylenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. *Lipids*, 853-856

Jung UJ, and Choi MS. (2014) Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *nt. J. Mol. Sci.*, 15, 6184-6223; doi:10.3390/ijms15046184

Kadowaki T., Yamauchi T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005; 26:439-51.

Kanemaki T, Kitade H, Kaibori M, Sakitani K, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, Ito S, Okumura T. (1998) Interleukin 1beta and interleukin 6, but not tumor necrosis factor alpha, inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology*. May;27(5):1296-303.

Kang, KT. (2014). "Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension." *Toxicological research* 30(3): 141.

Kannel WB. (2000) Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension. *Journal of Human Hypertension* 14 83–90. (doi:10.1038/sj.jhh.1000949).

Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. (2012) Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue *Scientific Reports*, 2-799 | DOI: 10.1038/srep00799.

Ko HJ, Zhang Z, Jung DY, Jun JY, Ma Z, K.E. Jones, et al (2009) Nutrient stress activates inflammation and reduces glucose metabolism by suppressing AMP-activated protein kinase in the heart *Diabetes*, 58, pp. 2536–2546

Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MAM, Carvalho CRO, Rossoni LV. (2010) Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *Journal of Hypertension* 2010; Vol 28 No 10 DOI:10.1097/HJH.0b013e32833ca68c

Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, Hutchinson WL, Pepys MB. (1999) C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men. *Circulation*, 99:237–242.

Kraemer-Aguiar LG, de Miranda ML, Bottino DA, Lima Rde A, de Souza Md, Balarini Mde M, Villela NR, Bouskela E. (2015) Increment of body mass index is positively correlated with worsening of endothelium-dependent and independent changes in forearm blood flow. *Front Physiol.* Aug 11;6:223. doi: 10.3389/fphys.2015.00223. eCollection 2015.

Kraemer-Aguiar LG, Laflor CM, Bouskela E. (2008) Skin microcirculatory dysfunction is already present in normoglycemic subjects with metabolic syndrome. *Metabolism*, 57:1740–1746.

Kurtel H, Rodrigues SF, Yilmaz CE, Yildirim A, Granger DN. (2013) Impaired vasomotor function induced by combination of hypertension and hypercholesterolemia. *J Am Soc Hypertens*, jan-feb;7(1):14-23 doi:10.1016/j.jash.2012.11.005

Lau D.C.W., Dhillon B., Yan H., Szmitko P.E., Verma S. Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005;288: H2031–H2041, doi:10.1152/ajpheart.01058.2004.

Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P (2005) Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension* 45: 1050–1055.

Lee I.M., Shiroma E.J., Lobelo F., Puska P., Blair S.N., et al.(2012) Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *The Lancet*, 380: 219–229.

Lee J. (2013) Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 Diabetes *Arch Pharm Res*. Feb;36(2):208-22. doi: 10.1007/s12272-013-0023-8. Epub 2013 Feb 10.

Lee YH, Pratley RE. (2005) The Evolving Role of Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. *Curr Diab Rep*. Feb;5(1):70-5. Review.

Leggate M, Carter, W. G., Evans, M.J.C., Vennard, R.A. Sribala-Sundaram S., A. Nimmo, M.A. (1985) Determination of inflammatory and prominent proteomic changes in plasma and adipose tissue after high-intensity intermittent training in overweight and obese males *J Appl Physiol*, Apr;112(8):1353-60. doi: 10.1152/jappphysiol.01080.2011. Epub 2012 Jan 19.

Lehr S., Hartwig S., Sell H. (2012) Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*, 6:91-101.

Leite LD, Rocha ED. (2009) Brandão-Neto J .Obesity: an inflammatory disease. *Revista Ciência & Saúde*, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul./dez.

Lerman LO, Lerman A. (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:168–175.

Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 329, 1988–1992

Lionetti L., Mollica M.P., Lombardi A., Cavaliere G., Gifuni G., et al. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009, 19: 146–152.

Lopes H.F. Hypertension and inflammation: contribution of obesity. *Rev Bras Hipertens*, 2007.vol.14(4): 239-244.

Lowry OH, Rosebrough NF, Farr AL, Randal RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193: 265-275.

Malnick SD, Knobler H. (2006) The medical complications of obesity. *Sep;99(9):565-79.* Epub 2006 Aug 17.

Manabe, I (2011). Chronic inflammation links cardiovascular metabolic and renal diseases. *Circ. J.* 2011;75, 2739–2748.

Martínez-Martínez E, Miana M, Jurado-López R, Bartolomé MV, Souza Neto FV, Salaices M, López-Andrés N, Cachofeiro V. (2014) The potential role of leptin in the vascular remodeling associated with obesity. *Int J Obes (Lond).* Dec;38(12):1565-72. doi: 10.1038/ijo.2014.37. Epub 2014 Mar 3.

Mark, A. L., Correia, M. L., Rahmouni, K., and Haynes, W. G. (2002) *J. Hypertens.* 20, 1245–1250

Miller WM, Nori Janosz KE, Yanez J, McCullough PA. (2005) Effects of weight loss and pharmacotherapy on inflammatory markers of cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* , ;3(4):743–59.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppel SW. (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4196.

Moore SA, Hallsworth K, Plotz T, Ford GA, Rochester L, Trenel MI.(2013) Physical Activity, Sedentary Behaviour and Metabolic Control following Stroke: A Cross-Sectional and Longitudinal Study *PLoS ONE*, 8(1): e55263. doi:10.1371/journal.pone.0055263.

Mota G. R., Zanesco A. (2007) Leptina, Ghrelina e Exercício Físico. *Arq Brás Endocrinol Metab*, 51/1:25-33.

NHANES III, (2012) <http://www.cdc.gov/obesity/data/adult.html>, NCHS Data Brief, Number 82, January.

Nieto-vasquez I, Fernandez-Veledo S, De Alvaro C, Lorenzo M (2008) Dual role of interleukin 6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes* 57:3211.

Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH, Staprans I, Grunfeld C, Feingold KR. (1995) Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*. 1995; 136(5):2143-9.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. (2006) Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA*, 295:1549–1555.

Oishi JC, Buzinnari TC, Pestana CR, De Moraes TF, Vatanabe IP, Wink DA, Da Silva RS, Bendhack LM, Rodrigues GJ. (2015) In vitro Treatment with cis-[Ru(H-dcbpy)₂(Cl)(NO)] Improves the Endothelial Function in Aortic Rings with Endothelial Dysfunction. *J Pharm Pharm Sci.* Dec;18(5):696-704.

Olefsky J. M., Glass C. K. (2009) "Macrophages, inflammation, and insulin resistance," *Annual Review of Physiology*, vol. 72, pp. 219–246.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. (2000) Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NFκB signalling through a camp-dependent pathway. *Circulation*, 102: 1296.

Panazzolo D, Sicuro FL, Clapauch R, Maranhão P, Bouskela E, Kramer-Aguiar LG. (2012) Obesity, metabolic syndrome, impaired fasting glucose, and microvascular dysfunction: a principal component analysis approach. *Cardiovascular Disorders*, 12:102.

Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, Kauter K, Sernia C, Campbell F, Ward L, Gobe G, Fenning A, Brown L. (2011). High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57(5): 611-624.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JJ, Epstein SE. (1990) Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England journal of medicine.* 1990; 323:22–27. [PubMed: 2355955].

Parks HS, Park JY, Yu R. (2005) Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF – alpha and IL 6. *Diabetes Res. Clin Pract*, 1:29-35.

Pereira FH, Batalhão ME, Cárnio EV. (2014) Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Jan.-Feb.;22(1):123-8 DOI: 10.1590/0104-1169.2896.2392

Petrica L, Petrica M, Vlad A, Dragos JC, Gluhovschi G, Ianculescu C, Dumitrascu V, Giju S, Gluhovschi C, Bob F, Ursoniu S, Gadalean F, Velciov S, Bozdog G, Marian R, Ianculescu C. (2009) Nephro- and neuroprotective effects of rosiglitazone versus glimepiride in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Wien Klin Wochenschr* 121: 765– 775, 2009.

Prado WL, Lofrano MC, Oyama LM, Dâmaso AR. (2009) Obesity and Inflammatory Adipokines: Practical Implications for Exercise Prescription. *Rev Bras Med Esporte*, Vol. 15, No 5 – Set/Out.

Prieto D, Contreras C, Sánchez A. (2014) Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance *Curr Vasc Pharmacol*. May;12(3):412-26.

Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broed UC. (2008) Adipokines and Insulin Resistance, *Mol Med*, Nov-Dec; 14(11-12): 741–751.

Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG (2005) Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 54:2012–2018.

Rahmouni K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL. (2009) Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* 58: 536–542.

Ravussin E. Adiponectin enhances insulin action by decreasing ectopic fat deposition. *The Pharmacogenomics Journal* (2002) 2, 4–7. doi:10.1038/sj.tpj.6500068.

Reissigová J, Tomecková M. (2005) State of the art coronary heart disease risk estimations based on the Framingham heart study. *Cent Eur J Public Health*. Dec;13(4):180-6. Review.

Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, Saari JT, Ren J. (2006) High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*.24(3):549–561. [PubMed]

Ridker PM. (2003) Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*. 2003, 107: 363–369.

Rodrigo R, Gonzalez J, Paoletto F. (2011) The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertension Research*, 34, 431–440.

Rodrigues GJ, Pereira AC, Vercesi JA, Lima RG, Silva RS, Bendhack LM. (2012) Hypotensive Effect in Renal Hypertensive Rats Induced by Nitric Oxide Released From a Ruthenium Complex. *J Cardiovasc Pharmacol*. Aug;60(2):193-8. doi: 10.1097/FJC.0b013e31825bacc4. PMID: 2263507

Rodrigues GJ, Pereira AC, Vercesi JA, Lima RG, Silva RS, Bendhack LM. (2012) Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. *J Cardiovasc Pharmacol*. Aug;60(2):193-8. doi: 10.1097/FJC.0b013e31825bacc4.

Sakurai T, Izawa T, Kizaki T, Ogasawara JE, Shirato K, Imaizumi K, Takahashi K, Ishida H, Ohno H. (2009) Exercise training decrease expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 605–609.

Salmanoglu DS, Gurpinar T, Vural K, Ekerbicer N, Dariverenli E, Var A. (2016) Melatonin and L-carnitin improves endothelial dysfunction and oxidative stress in Type 2 diabetic rats. *Redox Biol.* Aug;8:199-204. doi: 10.1016/j.redox.2015.11.007. Epub 2016 Jan 13.

Samad F, Yamamoto K, Loskutoff DJ. (1996) Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1996; 97: 37.

Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. (1997) Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol Med* 1997; 3: 37.

Sartipy P., Loskutoff D.J (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:7265.

Savage D.B, Sewter C.P., Klenk E.S., Segal D.G., Vidal-Puig A., Considine R.V., O'Rahilly S. (2001) Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*, 50(10):2199-202.

Schulz E, Gori T, Münzel T. (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension Research*, 34, 665-673,doi:10.1038/hr.2011.39.

Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. (2003) Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes* 52: 2867–2873.

Smitka K, Marešová D. (2015) Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague Med Rep*, 116(2):87-111. doi: 10.14712/23362936.2015.49.

Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, Frisbee JC. (2008) Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology* 2008; august; 15(2): 79-89, doi:10.1016/j.pathophys.2008.04.007.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. (1996) Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1996; 97:2601 [PubMed: 8647954].

Storey, KB. (1996) Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Baz. J. Med. Res.*, v 29, -1715-1733.

Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt ., Eckel J. (2012) Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302:H2148–65.

Tchernof A, Despres JP. (2013) Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev*; 93:359–404.

Tilg, Moschen, AR. (2008) Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol. Med.* 2008, 14: 222-231.

Torzewski, J, Torzewski, M, Bowyer, DE, Fröhlich, M, Koenig, W, Waltenberger, J, Fitzsimmons, C, Hombach, V. (1998) C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:1386–1392.

Treasure CB, Manoukian SV, Klein JL, Vita JA, Nabel EG, Renwick GH, Selwyn AP, Alexander RW, Ganz P (1992) Epicardial coronary artery responses to acetylcholine are impaired in hypertensive patients. *Circulation research.* 71:776–781. [PubMed: 1516154].

Vaca CE, Wilhelm J and Harms-Ringdahl M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Research*, 195:137-149

Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444(7121): 875–880.

Vaněčková I, Maletínská L, Behuliak M, Nagelová V, Zicha J, Kuneš J.(2014) Obesity-related hypertension: possible pathophysiological mechanisms *Journal of Endocrinology*223, R63–R78

Vanhoutte PM.(1988) The endothelium – modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med*, 319: 512–513.

Vickers SP, Jackson HC, Cheetham S. (2011) The utility of animal models to evaluate novel anti-obesity agents. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct; 164(4): 1248–1262. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01245.x PMID: PMC3229760

Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Rocha M. (2009) Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis: Mitochondria-Targeted Antioxidants as Potential Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 4654-4667

Victor, VM, Rocha, M. (2007) Targeting Antioxidants to Mitochondria: A Potential New Therapeutic Strategy for Cardiovascular Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 845-863.

Vigitel Brasil (2014). Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças Crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2015.

Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. (2007) Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab*, 9:813-839.

Virdis A, Santini F, Colucci R, Duranti E, Salvetti G, Rugani I, Segnani C, Anselmino M, Bernardini N, Blandizzi C, Salvetti A, Pinchera A, Taddei S. (2011) Vascular generation of tumor necrosis factor- α reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *J Am Coll Cardiol*, 58(3): 238-47.

Volp, A. C.P., Alfenas R.C.G., Costa N.M.B., Minim V.P.R., Stringueta P.C. Bressan J. (2008) Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 52, n. 3, Apr.

Weisberg SP, McCann D, Desai M., Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112: 1796–1808.

Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sápi Z, Ory I, Salamon F, Kovács M, Vargha P, Szekeres O, Speer G, Karádi I, Sikter M, Kaszás E, Dworak O, Gerö G, Cseh K.(2003) Expression of tumor necrosis factor (TNF-alfa) protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alfa, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level. *Eur J Endocrinol.*;149(2):129-35.

Wisse, BE. (2004) The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *J Am Soc Nephrol* 15: 2792–2800.

Wobst, J., Rumpf, P.M., Dang, T.A., Segura-Puimedon, M., Erdmann, J., and Schunkert, H. (2015). Molecular Variants of Soluble Guanylyl Cyclase Affecting Cardiovascular Risk. *Circulation Journal* 79(3): 463-469.

Wong GW, Wang J., Hug C, Tsao TS, Lodish HF.(2004) A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad SciUSA*. 101:10302-7.

World Health Organization (2016) - Global report on diabetes. Diabetes Mellitus – epidemiology. 2. Diabetes Mellitus – prevention and control. 3. Diabetes, Gestational. 4. Chronic Disease. 5. Public Health. I. World Health Organization.

World Health Organization (WHO) (2011) Cardiovascular Diseases. Available: <http://www.who.int/cardiovascular-diseases/en/>. Accessed 10 July 20115.

Wu JT, Wu LL. (2006) Linking inflammation and atherogenesis: Soluble markers identified for the detection of risk factors and for early risk assessment. *Clin Chim Acta.* 366:74-80.

Xi L, Qian Z, Xu G, Zhou C, Sun S. (2007) Crocetin attenuates palmitate induced insulin insensitivity and disordered tumor necrosis factor-alpha and adiponectin expression in rat adipocytes. *Br J Pharmacol.* 151: 610–617.

Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J, Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insulin resistance. *J Clin Invest.*;112: 1821–1830.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*, 2001; 7: 941-946.

Ye J, McGuinness OP. (2012) Inflammation during obesity is not all bad: Evidence from animal and human studies *Am J Physiol Endocrinol Metab* (December 26), doi:10.1152/ajpendo.00266.

Yiannikouris F, Gupte M, Putnam K, Thatcher S, Charnigo R, Rateri DL, Daugherty A, Cassis LA. (2012) Adipocyte Deficiency of Angiotensinogen Prevents Obesity-Induced Hypertension in Male Mice. *Hypertension*, 60:1524-1530.

Yndestad A, Damås JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P (2006) Systemic inflammation in heart failure--the whys and wherefores. *Heart Fail Rev.* 2006 Mar;11(1):83-92.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, and Coppack SW. (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial

dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 972–978.

Zalesin KC, Franklin BA, Miller WM, Peterson ED, McCullough PA. (2011) Impact of obesity on cardiovascular disease. *Med Clin North Am*, Sep;95(5):919-37. doi: 10.1016/j.mcna.2011.06.005. Review.

Zamboni M., Mazzali G., Zoico E., Harris T.B., Meigs J.B., Di Francesco V., Fantin F., Bissoli L., Bosello O. Health consequences of obesity in the elderly: a review of four unresolved questions. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Sep;29(9):1011-29.

Zang H, Park Y, Wu J, Chen Xp, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. (2009) Role of TNF- α in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, 116:219-30.

Zecchin HG, Priviero FB, Souza CT, Zecchin KG, Prada PO, Carnevalheira JB, Velloso LA, Antunes E, Saad MJ. (2007) Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes*, Apr;56(4):1014-24. Epub 2007 Jan 17. PMID17229938.

Zeiger AM, Schachinger V, Minners J. (1995) Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation*. 92:1094–1100. [PubMed: 7648652].

Zhang H, Park Y, Wu J, Chen Xp, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. (2009) Role of TNF- α in vascular dysfunction, *Clinical Science* 116, 219–230 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/CS20080196.

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 :1784 1789.