

ANTONIO GARCIA SOARES JÚNIOR

**OBESIDADE INDUZ ALTERAÇÕES ARTÉRIAS-ESPECÍFICA:
AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL E DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS
MUSCULARES LISAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

Soares AG. Obesidade induz alterações artéria-específica: avaliação da função endotelial e do fenótipo das células musculares lisas. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A obesidade pode mudar as características das células endoteliais e musculares lisas (CMLVs). Reatividade e genes inflamatórios e de marcadores de fenótipo de CMLVs foram avaliados em artérias mesentéricas de resistência (AMRs) e de aorta de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (OB). RNAm para citocinas pró-inflamatórias e IL-10 foi aumentado em AMRs e aorta de OB. O relaxamento não foi alterado, mas a contração foi reduzida em AMRs e aorta de OB. AMRs apresentaram redução global da contração, mas a aorta apresentou redução específica para agonista adrenérgico. Maior modulação negativa por NO e prostanoídes vasodilatadores foi observada em aorta, mas não em AMRs. RNAm para marcador do fenótipo sintético foi aumentado em AMRs de OB. Esses resultados mostram que as células endoteliais e as CMLVs de AMRs e aorta respondem diferentemente à obesidade. Inflamação e mecanismo de contrarregulação são induzidos em AMRs e aorta, que impediria a disfunção endotelial, mas não a mudança fenotípica das CMLVs em AMRs, que então, comprometeria sua capacidade contrátil.

Palavras-chave: Endotélio vascular. Músculo liso vascular. Obesidade. Óxido nítrico.

ABSTRACT

Soares AG. Obesity leads to artery-specific alterations: evaluation of the endothelial function and smooth muscle cell phenotype. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Obesity may change the characteristics of vascular endothelial cells and smooth muscle cells (VSMCs). Vascular reactivity and gene expression of inflammatory and phenotypic markers for VSMC were evaluated in resistance mesenteric arteries (RMAs) and aorta from mice fed with high fat diet (OB). Pro-inflammatory cytokines and IL-10 mRNA were elevated in OB's RMAs and aorta. The relaxation was unchanged, however a reduction in contractility was observed in OB's RMA and aorta. A global reduction in contractility was observed in RMAs but aorta demonstrated a specific reduction to adrenergic agonist. Higher negative modulation by NO and vasodilator prostanoids were observed only in aorta. Phenotypic marker mRNA was elevated in OB's RMA. The results show that endothelial cells and VSMCs from RMAs and aorta respond differently to obesity. Inflammation and counter regulatory mechanisms are induced in RMAs and aorta of which would prevent endothelial dysfunction but not the VSMC phenotypic switching in RMAs, compromising the contractile ability.

Keywords: Nitric oxide. Obesity. Vascular endothelium. Vascular smooth muscle cell.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

Obesidade é definida como o excesso de gordura acumulada nos diversos depósitos distribuídos pelo organismo. O índice de massa corpórea (IMC) é utilizado para classificar os indivíduos levando-se em conta a massa corpórea e altura. Atualmente outras metodologias são aplicadas para uma classificação mais precisa, são exemplos destas o comprimento da circunferência abdominal, que possui uma correlação positiva com doenças cardiovasculares, a espessura da pele e bioimpedância (Kopelman, 2000). Cada uma destas metodologias apresentam suas vantagens e desvantagens. O IMC (peso em kg / altura²) está correlacionado com a medida de densidade corporal, no entanto não tem a capacidade de distinguir entre massa magra (músculo) e massa gorda (tecido adiposo). Ainda assim, a Organização Mundial de Saúde define a obesidade como um IMC acima de 30 (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação de sobrepeso segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

IMC (kg x m⁻²)	Classificação OMS	Descrição popular
< 18,5	Baixo peso	Magro
18,5 – 24,9	-	Saudável, normal
25,0 – 29,9	Sobrepeso de Grau 1	Sobrepeso
30,0 – 39,9	Sobrepeso de Grau 2	Obesidade
≥ 40,0	Sobrepeso de Grau 3	Obesidade Mórbida

IMC, índice de massa corpórea.

Obesidade e sobrepeso são duas manifestações clínicas caracterizadas por alterações no metabolismo e no comportamento. Motivo este que têm levado alguns pesquisadores a classificar a obesidade como doença (Allison et al., 2008). A obesidade refere-se especificamente ao acúmulo excessivo de tecido adiposo, onde tanto o bem-estar quanto a saúde do indivíduo portador desta condição estão prejudicados. Além do mais a obesidade pode ser classificada de acordo com os depósitos de tecido adiposo no organismo. A obesidade visceral (central ou androide) é aquela em que o tecido adiposo visceral leva ao aumento na

circunferência abdominal e é mais comum em homens. A obesidade periférica (ginoide) acomete depósitos de gordura subcutâneos e é mais frequente em mulheres. Essa metodologia de caracterização acaba fornecendo um parâmetro mais preciso na determinação da obesidade e da sua relação com doenças cardiovasculares (Janssen et al., 2004).

Com uma alta prevalência na população em países desenvolvidos e em desenvolvimento, há alguns anos a obesidade tem sido considerada uma epidemia. A Organização Mundial da Saúde estima que até o ano 2030 cerca de 370 milhões de pessoas serão obesas (Alam et al., 2012; Kopelman, 2000).

No Brasil, segundo a publicação “Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009” do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), aproximadamente 50% da população tem excesso de peso, enquanto a porcentagem de indivíduos obesos é de 12% no sexo feminino e de 16% no sexo masculino, e estima-se que um terço da população brasileira será obesa nos próximos 10 anos. Divulgado no final do mês de maio de 2014, a pesquisa “Vigitel” (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, 2014), realizada pelo Ministério da Saúde, apontou que, após aumentos constantes nos últimos 8 anos, o índice de indivíduos obesos no Brasil está estabilizado (Figura 1). Destaca-se nos estudos epidemiológicos, o fato da obesidade acometer uma grande quantidade de crianças ou indivíduos na fase juvenil (IBGE, 2010; Reinehr, 2013; WHO, 2014).

Frequência de obesidade na população brasileira

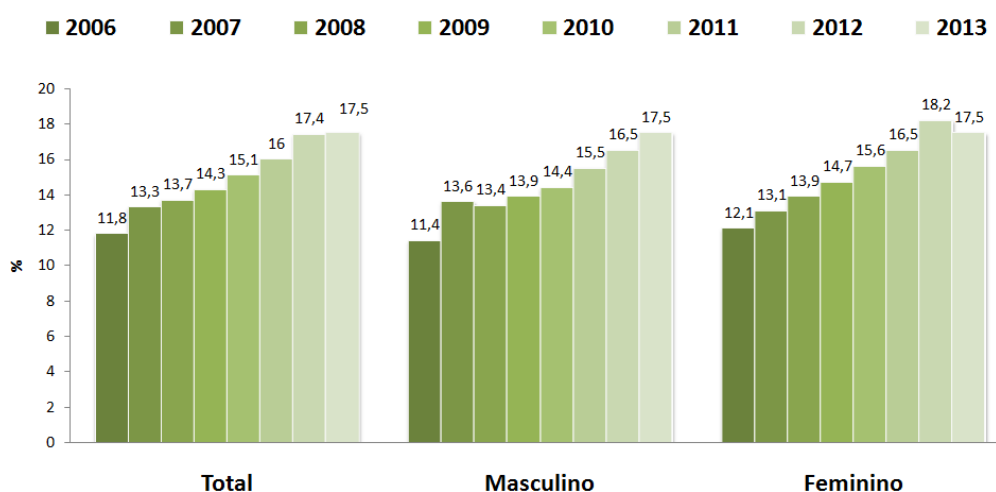


Figura 1 - Fonte: Vigitel, Ministério da Saúde, Brasil, 2014.

A ingestão de alimentos com o intuito de se obter a quantidade necessária de energia para manter o organismo é essencial para a sobrevivência, entretanto o excesso da ingestão é um dos pilares no desenvolvimento da obesidade. Aumento do consumo energético tem impacto sobre o volume e pressão sanguíneos, termorregulação, estresse psicológico e obviamente o metabolismo (Begg, Woods, 2013).

Fatores culturais têm sido atribuídos ao aumento nos índices de indivíduos obesos. Características socioeconômicas, urbanização e dietas inadequadas são algumas características culturais importantes. Um exemplo do impacto socioeconômico é aquele em que uma família de baixa renda passa a ter condições financeiras para consumir alimentos industrializados ricos em gorduras e sódio (Malik et al., 2013).

A genética possui um papel chave no desenvolvimento da obesidade. Mais de 50 genes foram associados com obesidade e, ainda assim, muito pouco se sabe sobre a relação destes com a grande variação do IMC em humanos (Sandholt et al., 2012).

Obviamente, a falta de atividade física associada aos fatores já citados demonstra como a relação entre eles é extremamente danosa ao organismo, uma vez que o desequilíbrio energético (ingesta > consumo) culmina em aumento dos depósitos de gordura distribuídos no organismo (Hill et al., 2012; Kopelman, 2000).

Aumento da ingestão de alimentos ricos em gorduras levam à resistência à insulina, dislipidemia, hiperleptinemia, estresse oxidativo e hipertensão (Abate, 1996; Avogaro, Kreutzenberg, 2005; Barnard et al., 1998; Bastien et al., 2014; Ghibaudi et al., 2002; Roberts et al., 2006). Todos esses parâmetros estão relacionados ao aumento no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (Michas et al., 2014).

Outro parâmetro importante é a liberação de diversos mediadores inflamatórios pelos adipócitos, levando a uma inflamação sistêmica. Assim, a inflamação presente na obesidade passa a ter um papel importante no desenvolvimento de outras patologias em indivíduos obesos, por exemplo, a associação entre doença coronariana e obesidade se deve a vias relacionadas à inflamação (Bahrami et al., 2008). O aumento do tecido adiposo promove inflamação sistêmica devido à secreção de fatores pró-inflamatórios, como por exemplo, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), leptina e inibidor do ativador de plasminogênio-1 (Berg, Scherer, 2005; Thalmann, Meier, 2007). Tais fatores exercem efeitos sistêmicos sobre o metabolismo da glicose (Kim et al., 2004), o metabolismo dos lipídios (Klover et al., 2003) e da função cardiovascular (Wimalasundera et al., 2003). Ainda, a obesidade parece induzir inflamação vascular, pois foi demonstrado que aorta de camundongos fêmeas obesas apresentou aumento da expressão proteica de TNF- α e da ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e a inibição local do NF- κ B foi capaz de corrigir a disfunção endotelial, avaliada pelo relaxamento dependente do endotélio (Kobayasi et al., 2010).

1.1.1 Obesidade e função vascular

Responsável por transportar oxigênio e nutrientes para os tecidos e remover os produtos do metabolismo, o sistema vascular tem participação ativa na manutenção da homeostasia. O endotélio vascular possui um papel chave nesse processo, uma vez que o mesmo atua não somente como barreira passiva entre plasma e líquido extracelular, mas também como fonte de um grande número de mediadores. Estes controlam ativamente o tônus vascular, bem como influenciam as

funções plaquetárias, das células mononucleares e a hemostasia (Kalebic et al., 1983; Fischer et al., 2006).

As células endoteliais estão envolvidas em atividades metabólicas intensas com uma grande heterogeneidade na qual deve-se considerar fatores como o leito vascular, o tamanho ou o tipo do vaso (artérias, veias ou capilares) (Aird, 2007a; Aird, 2007b). Além de seu envolvimento na hemostasia, as células endoteliais podem metabolizar ou inativar inúmeros fatores circulantes como hormônios polipeptídicos vasoativos, aminas, nucleotídeos, lipoproteínas, metabólitos do ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio (Fischer et al., 2006).

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador do sistema nervoso e do sistema cardiovascular e está envolvido nas respostas dos macrófagos a estímulos inflamatórios, tais como lipopolissacarídeos bacterianos e interferon- γ , e na sua capacidade de matar células tumorais ou bactérias (Hibbs et al., 1987; Stuehr, Marletta, 1987). Existem diferentes tipos de enzimas responsáveis pela síntese de NO: NO sintase endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). Na parede vascular, os três tipos podem estar presentes. A nNOS é expressa não só em nervos perivasculares, mas também pode ser detectada em células endoteliais e do músculo liso (Boulanger et al., 1998). A expressão de iNOS foi detectada em todas as células nucleadas do sistema cardiovascular (Papapetropoulos et al., 1999). A eNOS é expressa não só em células endoteliais mas também em miócitos cardíacos e plaquetas (Balligand et al., 1993; Sase, Michel, 1995). As três enzimas NOS contêm um domínio redutase e um oxigenase e possuem como substrato a L-arginina, que na presença de oxigênio molecular, catalisam a oxidação de cinco elétrons de um dos átomos de nitrogênio da L-arginina. Todas exigem a presença dos cofatores NADPH, FAD, FMN, heme, tetrahydrobiopterina (BH₄) e zinco (Bredt, Snyder, 1994). A conversão de L-arginina a NO pela eNOS e nNOS é dependente de cálcio enquanto a ativação da iNOS é independente de cálcio (Bredt, 1999).

Diversos são os fatores de risco, como sobrepeso, tabagismo, diabetes, aumento da pressão arterial e níveis elevados de lipídios circulantes, que podem promover alterações no endotélio vascular, levando a uma redução na biodisponibilidade de NO e desse modo alterar a homeostasia vascular (Bastien et al., 2014). As comorbidades que frequentemente estão associadas à obesidade também possuem um papel importante na promoção de alterações na função vascular, promovidas por citocinas pró-inflamatórias, pelo aumento da formação de

espécies reativas de oxigênio e de produtos de glicação avançada (Hofmann et al., 2014). Logo, é de se esperar que com as diversas alterações metabólicas alterações estruturais/funcionais sejam observadas na vasculatura de indivíduos obesos (Rizzoni et al., 2011).

As células musculares lisas (CMLVs) são o único tipo celular da camada média e as principais células estromais da parede vascular, assumindo uma variedade de diferentes funções fisiológicas e estruturais. Por exemplo, as CMLVs produzem componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento, tornando possível que a parede arterial tenha capacidade de suportar a alta pressão do sangue circulante, e participam da reparação arterial depois de injúrias na vida adulta. Nos vasos de resistência, as CMLVs mantêm um tônus contrátil variável, que regula a pressão arterial e a redistribuição do fluxo sanguíneo. Devido à pressão gerada, estresse mecânico e deformação são gerados na parede arterial de vasos de resistência e de condutância, fazendo com que uma condutância hidráulica radial ocorra através da parede, carregando substâncias solúveis a partir da corrente sanguínea. As CMLVs na camada média são altamente responsivas ao estresse mecânico e às moléculas carregadas radialmente, modificando o ambiente da parede vascular.

O músculo liso vascular adquire um fenótipo, que pode variar ao longo de um contínuo de um espectro, onde em uma extremidade está o fenótipo contrátil quiescente e na outra o fenótipo sintético proliferativo, por causa da sua capacidade em reprogramar o padrão de expressão de genes específicos. A CMLV apesar de encontrar-se num estado quiescente em indivíduos adultos, altera sua programação e o seu fenótipo em resposta a fatores de crescimento, forças mecânicas, interações célula-célula e célula-matriz, bem como a vários mediadores inflamatórios (Kawai-Kowase, Owens, 2007; Morrow et al., 2005a). A CMLV mantém o fenótipo contrátil em condições fisiológicas normais, como resultado de uma regulação balanceada da expressão de genes contráteis e sintéticos (Proweller et al., 2005). Durante o processo de remodelamento vascular em decorrência dos estímulos diversos aos quais a vasculatura está exposta, diferentes genes passam a ter um papel importante na regulação desse processo. Dentre eles, podemos citar o Notch 3 pertencente à família de genes que codificam grandes receptores transmembranas responsáveis por transdução de sinais entre células vizinhas. É uma via de sinalização altamente conservada durante a evolução, e crítico durante o

desenvolvimento embrionário (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Baron, 2003; Baron et al., 2002; Bray, 2006). Em mamíferos existem 4 tipos de receptores Notch (1-4) e cinco ligantes, Jagged1 e 2, tipo-Delta 1, 3 e 4, sendo esses ligantes proteínas transmembranas.

No sistema cardiovascular, a sinalização via receptores Notch participa de diversos aspectos do desenvolvimento incluindo vasculogênese, angiogênese, diferenciação e remodelamento da célula muscular lisa (Alva, Iruela-Arispe, 2004; Iso et al., 2003); e alterações na via de sinalização do receptor Notch pode levar a um desenvolvimento vascular anormal (Wang et al., 2008).

Em humanos adultos, a isoforma Notch 3 é expressa somente na CMLV (Villa et al., 2001). A importância funcional do receptor Notch 3 na CMLV adulta é demonstrada em condições genéticas causada pela mutação neste gene levando a condição CADASIL (arteriopatía cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia). Essa condição afeta o fluxo em pequenos vasos sanguíneos cerebrais onde as CMLV são anormais, levando a morte de células vasculares de forma gradativa (Joutel et al., 2000).

Como exemplo de um processo inflamatório na vasculatura, a aterosclerose apresenta detalhes importantes para se entender as alterações estruturais locais em resposta a estímulos pró-inflamatórios. As alterações patológicas na estrutura do vaso se devem, em parte, por mudanças nas vias de sinalização que regulam a transição de CMLV de seu fenótipo contrátil para um fenótipo que permita que elas migrem para a camada íntima (Lusis, 2000; Ross, 1999). Uma vez diferenciadas e realocadas, as CMLVs são capazes de sintetizar e secretar diversas proteínas da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos) que são requisitados para gerar a capa fibrosa que encapsulará as células esponjosas.

Durante esse processo, há a participação dos componentes da via de sinalização Notch. Notch 1 e Notch 3 regulam alterações nas CMLVs e controlam o crescimento e migração em resposta a fatores de crescimento devido à injúria vascular (Morrow et al., 2008; Sweeney et al., 2004). Notch 3 também promove resistência a apoptose em CMLV na camada íntima, o que é uma característica da resposta à lesão vascular e regula a consequente formação da camada neointima. (Campos et al., 2002; Sweeney et al., 2004; Wang et al., 2002b). A sinalização via Notch também reprime a diferenciação celular dependente de miocardina em CMLVs e a manutenção do fenótipo contrátil destas células (Proweller et al., 2005).

A proteína SM22 α é uma proteína do citoesqueleto que se liga a actina, sendo considerada um marcador do fenótipo contrátil em CMLV, e está envolvida em doenças vasculares como aterosclerose, onde sua expressão apresenta-se reduzida (Sobue et al., 1999; Weissberg et al., 1995). Shen e colaboradores (2011) demonstraram que redução da expressão desta proteína está relacionada com o estado inflamatório das CMLV. Assim, uma redução na expressão de SM22 α seria considerado um marcador de inflamação celular e um importante alvo terapêutico para o tratamento de doenças vasculares (Shen et al., 2011).

Mudança para um fenótipo sintético das CMLVs está entre as alterações vasculares que ocorre no envelhecimento (Lacolley et al., 2012). Outras alterações incluem síntese de matriz extracelular, perfil pró-inflamatório, apoptose e senescência celular. Senescência celular é definida biologicamente como uma parada irreversível do ciclo celular ou redução da capacidade replicativa de uma célula após certo número de divisões, porém pode ocorrer em resposta ao aumento da expressão de fatores de supressão tumoral, como p53, p27 e p21, independentemente da idade replicativa da célula, e é considerada um mecanismo de supressão tumoral (Campisi, 1996). A mudança fenotípica das CMLVs no envelhecimento pode ter influência no processo de senescência celular, que por fim, levaria a alterações vasculares típicas do envelhecimento. A senescência celular se instala progressivamente no processo de envelhecimento, mas é acelerada por vários fatores de risco cardiovascular, tal como a obesidade, devido a ativação de vias inflamatórias (Erusalimsky, 2009; Versari et al., 2009; Wang et al., 2009).

Os estímulos físicos e mecânicos aos quais as CMLVs estão expostas variam de leito para leito por causa da função e localização de cada tipo de artéria. No entanto, o tecido adiposo perivascular (PVAT), que recobre a adventícia de praticamente todos os vasos sanguíneos do organismo, exceto a vasculatura cerebral, também varia de leito para leito (Gu, Xu, 2013; Szasz et al., 2013.). O PVAT secreta várias substâncias que agem de maneira parácrina sobre a parede vascular, modulando o tônus vascular e o perfil inflamatório (Szasz et al., 2013), mas o conjunto de substâncias secretadas varia de acordo com o tipo de PVAT. O PVAT da aorta torácica se assemelha ao tecido adiposo marrom e do leito mesentérico, da aorta abdominal e artérias coronárias se assemelha ao tecido adiposo branco visceral (Padilla et al., 2013). Essas diferenças podem refletir no microambiente

gerado pelos diferentes PVAT, pois foi demonstrado que o PVAT marrom de camundongos alimentados com ração hiperlipídica por 13 semanas possui maior resistência à inflamação do que o tecido adiposo branco visceral (Fitzgibbons et al., 2011). Portanto, podemos pensar que devido a essas diferenças, as alterações na parede vascular induzidas pela obesidade sejam leito-específicas.

Pelo exposto, fica claro que a estabilidade fenotípica das CMLVs é importante para a manutenção das funções vasculares. Considerando que a obesidade é caracterizada por um fenótipo vascular pró-inflamatório, que poderia levar à mudança fenotípica das CMLVs, e que as respostas dessas células aos estímulos inflamatórios dependem do microambiente em que elas estão inseridas e, que portanto, são leito-específicas, a nossa hipótese é que a obesidade altera diferentemente a reatividade de artérias de resistência e de condutância e que o perfil de expressão de genes inflamatórios, de marcadores de fenótipo de CMLVs e de senescência celular acompanham essa diferença.

1.2 Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da obesidade sobre a reatividade e o perfil de genes inflamatórios e de marcadores de fenótipo de CMLV e de senescência celular em artérias mesentéricas de resistência e de aorta torácica.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que:

- 1) dieta hiperlipídica por 16 semanas induz obesidade, alterações metabólicas e inflamação sistêmica;
- 2) a função endotelial de camundongos obesos está protegida das alterações metabólicas e inflamação, possivelmente por aumento da citocina anti-inflamatória IL-10;
- 3) artérias mesentéricas de camundongos obesos apresentam redução da capacidade contrátil global, que pode ser decorrente da presença de CMLVs com fenótipo sintético;
- 4) aorta de camundongos obesos apresenta redução específica da resposta contrátil induzida pela noradrenalina, que é decorrente da maior modulação negativa pelo NO e prostanoídes vasodilatadores.

REFERÊNCIAS*

Abate N. Insulin resistance and obesity. The role of fat distribution pattern. *Diabetes Care*. 1996;19:292-4.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function and mechanisms. *Circ Res*. 2007;100:158–73.

Alam I, Ng TP, Larbi A. Does inflammation determine whether obesity is metabolically healthy or unhealthy? The aging perspective. *Mediators of Inflammation*. 2012;456456.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366:1059–62.

Allison DB, Downey M, Atkinson RL et al. Obesity as a disease: a white paper on evidence and arguments commissioned by the Council of the Obesity Society. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 2008;16:1161–77.

Alpert MA, Lavie CJ, Agrawal H, Aggarwal KB & Kumar SA. Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Transl Res*. 2014;S1931-5244(14):00134-0.

Alva JA, Iruela-Arispe ML. Notch signaling in vascular morphogenesis. *Curr Opin Hematol*. 2004 Jul;11(4):278-83.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999; 284(5415):770-6.

Aviv A. Chronology versus biology: telomeres, essential hypertension, and vascular aging. *Hypertension*. 2002;40:229–32.

Avogaro A, Kreuzenberg S. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clinica Chimica Acta*. 2005;360:926.

Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signalling system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993(90):347–51.

Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol*. 1998;84:1311-1315.

Bahrami H, Bluemke DA, Kronmal R, et al. Novel metabolic risk factors for incident heart failure and their relationship with obesity: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51:1775–83.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2003;14(2):113-9.

Baron M, Aslam H, Flaszka M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, Wilkin MB. Multiple levels of Notch signal regulation (review). *Mol Membr Biol.* 2002;19(1):27-38.

Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2014;56:369–81.

Bhattacharya I, Mundy A, Widmer C, Kretz M, Barton M. Regional heterogeneity of functional changes in conduit arteries after high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.).* 2008;16:743–8.

Begg DP, Woods SC. The endocrinology of food intake. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9:584–97.

Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96:939–49.

Bernard D, Gosselin K, Monte D, et al. Involvement of Rel/nuclear factor-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence. *Cancer Res.* 2004;64:472–81.

Bohm F, Pernow J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2007;76:818.

Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 1998;83:1271–8.

Brasil. Ministério da Saúde. 2014. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=12453&catid=11&Itemid=103. Acesso em: 12 ago. 2014.

Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):678-89.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175–95.

Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Rad Res.* 1999;31: 577–96.

Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell.* 1996;84:497–500.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005;120:513–22.

Campos AH, Wang W, Pollman MJ, Gibbons GH. Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation. *Circ Res*. 2002;91(11):999-1006.

Climent B, Simonsen U, Rivera L. Effects of obesity on vascular potassium channels. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12:438–52.

Daniels S. Complications of obesity in children and adolescents. *Int J Obes. (Lond.)*. 2009;33Suppl1:S60-5.

Donato AJ, Black AD, Jablonski KL, Gano LB, Seals DR. Aging is associated with greater nuclear NF kappa B, reduced I kappa B alpha, and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. *Aging Cell*. 2008;7:805–12.

Erusalimsky JD. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol*. 1985;106:326–32.

Fan LH, Tian HY, Yang ML et al. High-fat diet may impair KATP channels in vascular smooth muscle cells. *Biomed Pharmacother*. 2009;63(2):165-70.

Fatani S, Pickavance LC, Sadler CJ et al. Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study. *Nutr Metab. (Lond)*. 2007;14:4:15.

Febbraio, M. Role of interleukins in obesity: implications for metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(6):312-9.

Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci. (Lond.)*. 2009;117:139–55.

Fitzgibbons TP, Kogan S, Aouadi M et al. Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1425–37.

Fischer C, Schneider M, Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. In: Moncada S, Higgs A, editors. *Handbook of pharmacology: the vascular endothelium II*. 2006. p. 157–212.

Furukawa A, Tada-Oikawa S, Kawanishi S, Oikawa S. H₂O₂ accelerates cellular senescence by accumulation of acetylated p53 via decrease in the function of SIRT1 by NAD⁺ depletion. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20:45–54.

Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10:274–83.

Gaal L, Mertens I, Block C. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444:875–80.

Gallou-Kabani C, Vigé A, Gross MS, et al. C57BL/6J and A/J Mice Fed a High-Fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(8):1996-2005.

Ghibaoudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity Res*. 2002;10:956–63.

Goodwill AG, Frisbee SJ, Stapleton, et al. Impact of chronic anticholesterol therapy on development of microvascular rarefaction in the metabolic syndrome. *Microcirculation*. 2009;16(8):667-84.

Gu P, Xu A. Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14:49–58.

Hallinan EA, Tsymbalov S, Dorn CR et al. Synthesis and biological characterization of L-N(6)-(1-iminoethyl)lysine 5-tetrazole-amide, a prodrug of a selective iNOS inhibitor. *J Med Chem*. 2002;45(8):1686–9.

Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 1987;235: 473–6.

Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012;126: 126–32.

Hofmann B, Yakobus Y, Indrasari M, et al. RAGE influences the development of aortic valve stenosis in mice on a high fat diet. *Exp Gerontol*. 2014;10:S0531-5565.

Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):543-53.

Janssen I, Katzmarzyk P, Ross R. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:379–84.

Joutel A, Andreux F, Gaulis S, et al. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J Clin Invest*. 2000;105:597–605.

Kalebic T, Garbisa S, Glaser B. Basement membrane collagen degradation by migrating endothelial cells. *Science*. 1983;221: 281–4.

Kawai-Kowase K, Owens G. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;292: C59–C69.

Ketonen J, Shi J, Martonen et al. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J*. 2010;74(7):1479-87.

Kim, HJ, Higashimori T, Park SY, et al. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 2004;53:1060–7.

Klover PJ, Zimmers TA, Koniaris LG, Mooney RA. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2003;52:2784–9.

Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, et al. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens*. 2010;28:2111–9.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635–43.

Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, et al. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 2012;95:194–204.

Lee M, Wang Y, Vanhoutte P. Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NFκB. *J Vasc Res*. 2010;47:287–98.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–84.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.

Malik V, Willett W, Hu F. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nature reviews. Endocrinology*. 2013;9:13–27.

Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol*. 2012;165:643–58.

Michas G, Micha R, Zampelas A. Dietary fats and cardiovascular disease: putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):320-8.

Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence contribution to atherosclerosis. *Circ. Res*. 2007;100:15–26.

Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, et al. Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J*. 2004;23: 212-220.

Morrow D, Sweeney C, Birney YA, Cummins PM, Walls D, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic strain inhibits Notch receptor signaling in vascular smooth muscle cells in vitro. *Circ Res*. 2005;96(5):567-75.

Morrow D, Guha S, Sweeney C, et al. Notch and vascular smooth muscle cell phenotype. *Circ Res*. 2008;5:1370-82.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977;41(1):19-26.

Mundy A, Haas E, Bhattacharya I, et al. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc Res*. 2007;73: 368-375.

Noronha BT, Li JMM, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes*. 2005;54:1082–9.

Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;304(7):R543-52.

Paigen B. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. *Am J Clin Nutr*. 1995;62:458–62S.

Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999;43:509–20.

Petro AE, Cotter J, Cooper DA, et al. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism*. 2004;53:454–7.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

Pierce G, Lesniewski L, Lawson B, Beske S, Seals D. Nuclear factor-kappaB activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation*. 2009;119:1284–92.

Prieto D, Contreras C, Sanchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12:412–26.

Proweller A, Pear WS, Parmacek MS. Notch signaling represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem*. 2005;280:8994–9004.

Reinehr T. Lifestyle intervention in childhood obesity: changes and challenges. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:607–14.

Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *Int J Obes. (Lond)*. 2011;35:891–8.

Rippe J, Crossley S, Ringer R. Obesity as a chronic disease: modern medical and lifestyle management. *J Am Diet Assoc*. 1998;98:S9–S15.

Rizzoni D, De Cluceis C, Porteri E, et al. Structural alterations in small resistance arteries in obesity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(1):56-62.

Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, et al. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*. 2006;55:928-34.

Rocha V, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:399–409.

Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138(5 Pt 2):S419-20.

Sachidanandam K, Hutchinson JR, Elgebaly MM et al. Differential effects of diet-induced dyslipidemia and hyperglycemia on mesenteric resistance artery structure and function in type 2 diabetes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328:123–30.

Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O. Beyond the fourth wave of genome-wide obesity association studies. *Nutr. Diabetes*. 2012;30;2: e37.

Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci*. 1995;57:2049–55.

Shen J, Yang M, Ju D, et al. Disruption of SM22 promotes inflammation after artery injury via nuclear factor kappaB activation. *Circ Res*. 2010;106:1351-62

Smith W, Garavito R, DeWitt D. Prostaglandin endoperoxide H synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 1996;271:33157–160.

Sobue K, Hayashi K, Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Mol Cell Biochem*. 1999;190(1-2):105-18.

Sotornik R, Brassard P, Martin E, Yale P, et al. Update on adipose tissue blood flow regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(10):E1157-70.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, et al. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97:2601–10.

Stuehr DJ, Marletta MA. Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res*. 1987;47:5590–5.

Sweazea KL, Walker BR. Impaired myogenic tone in mesenteric arteries from overweight rats. *Nutr Metab. (Lond)*. 2012;9(1):18.

Sweeney C, Morrow D, Birney YA, et al. Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J*. 2004;18:1421–3.

Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci (Lond)*. 2012;122:1–12.

Szasz T, Bomfim GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:105–16.

Thalmann S, Meier CA. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res*. 2007;75: 690–701.

Tian X, Wong WT, Xu A, et al. Uncoupling protein-2 protects endothelial function in diet-induced obese mice. *Circ Res*. 2012;110:1211–6.

Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther*. 2014;11:S0163-7258.

Traupe T, D'Uscio LV, Muentner K, et al. Effects of obesity on endothelium-dependent reactivity during acute nitric oxide synthase inhibition: modulatory role of endothelin. *Clin Sci (Lond.)*. 2002;103:Suppl 48:13S–15S.

Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002;415: 45–53.

Ungvari Z, Bailey-Downs L, Gautam T, et al. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66:866–75.

van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192:1731–44.

van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509:439–46.

Vanhala M, Vanhala P, Kumpusalo E, Halonen P, Takala, J. Relation between obesity from childhood to adulthood and the metabolic syndrome: population based study. *BMJ*. 1998;317(7154):319.

Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. The ageing endothelium, cardiovascular risk and disease in man. *Exper Physiol*. 2009; 94:317–21.

Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA et al. Loss of function mutation in toll-like receptor-4 does not offer protection against obesity and insulin resistance induced by a diet high in trans fat in mice. *J Inflamm (Lond)*. 2011;11:8(1):2.

Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev*. 2001;108(1-2):161-4.

Voorde J, Pauwels B, Boydens C, Decaluwé K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism*. 2013;62:1513–21.

Wang T, Baron M, Trump D. An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;96:499–509.

Wang W, Chen JX, Liao R et al. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3389–403.

Wang CY, Kim HH, Hiroi Y, et al. Obesity increases vascular senescence and susceptibility to ischemic injury through chronic activation of Akt and mTOR. *Sci Signal.* 2009;2(62):ra11.

Weissberg PL, Cary NR, Shanahan CM. Gene expression and vascular smooth muscle cell phenotype. *Blood Press Suppl.* 1995;2:68-73

Wimalasundera R, Fexby S, Regan L, Thom SA, Hughes AD. Effect of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1beta on endothelium-dependent relaxation in rat mesenteric resistance arteries in vitro. *Br J Pharmacol.* 2003;138:1285–94.

World Health Organization. The challenge of obesity in the WHO European Region. Copenhagen, Bucharest, 12 September, 2005.

Yan ZQ, Sirsjö A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hansson GK. Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19: 2854–62.

Zdanov S, Bernard D, Debacq-Chainiaux F, et al. Normal or stress-induced fibroblast senescence involves COX-2 activity. *Exp. Cell Res.* 2007; 313:3046–56.