

## Disfunção Endotelial e Inflamação Precedem a Elevação da Pressão Arterial Induzida por Dieta Hiperlipídica

*Endothelial Dysfunction and Inflammation Precedes Elevations in Blood Pressure Induced by a High-Fat Diet*

Jorge Camargo Oishi,<sup>1</sup> Cynthia Aparecida Castro,<sup>1</sup> Karina Ana Silva,<sup>1</sup> Victor Fabricio,<sup>1</sup> Evelin Capelari Cárnio,<sup>2</sup> Shane A. Phillips,<sup>3</sup> Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte,<sup>1</sup> Gerson Jhonatan Rodrigues<sup>1</sup>

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar),<sup>1</sup> São Paulo, SP - Brasil

Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto,<sup>2</sup> SP - Brasil

University of Chicago Medical Center,<sup>3</sup> Chicago, Illinois - USA

### Resumo

**Fundamento:** A obesidade leva a um estado de inflamação crônica, disfunção endotelial e hipertensão.

**Objetivo:** Estabelecer a sequência de eventos relacionados a marcadores inflamatórios, disfunção endotelial e pressão arterial sistólica (PAS) na obesidade em um modelo experimental.

**Métodos:** Ratos Wistar machos (8 semanas de idade) receberam dieta padrão (Controle – CT, n = 35) ou uma dieta palatável hiperlipídica (DHL, n = 35) por 24 semanas. A cada seis semanas, 7 animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para eutanásia. Foram determinados a PAS, e níveis séricos de interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$ , proteína C reativa, adiponectina e óxido nítrico. As funções do músculo liso endotelial e vascular foram determinadas na aorta dissecada, e medida a peroxidação lipídica. A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

**Resultados:** os níveis das citocinas pró-inflamatórias começaram a aumentar após seis semanas de dieta hiperlipídica, enquanto os níveis da citocina anti-inflamatória adiponectina diminuíram. Um resultado interessante foi a redução da função endotelial e do óxido nítrico após seis semanas no grupo DHL. Além disso, mostramos que a massa de tecido adiposo visceral total esteve negativamente correlacionada com função endotelial e positivamente correlacionada com a PAS.

**Conclusão:** Nossos resultados demonstram a progressão temporal dos efeitos deletérios e sua correlação com a obesidade. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(6):558-567)

**Palavras-Chave:** Hipertensão, Endotélio / anormalidades, Dieta Hiperlipídica, Óxido Nítrico, Dislipidemias.

### Abstract

**Background:** Obesity leads to a chronic inflammatory state, endothelial dysfunction and hypertension.

**Objective:** To establish the time-course of events regarding inflammatory markers, endothelial dysfunction, systolic blood pressure (SBP) in obesity in only one experimental model.

**Methods:** We fed male Wistar rats (eight-week age) with a standard diet (Control - CT, n = 35), or palatable high-fat diet (HFD, n = 35) for 24 weeks. Every six weeks, 7 animals from each group were randomly selected for euthanasia. SBP and serum levels of interleukin -6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , C-reactive protein, adiponectin and nitric oxide were determined. Endothelial and vascular smooth muscle functions were determined in dissected aorta and lipid peroxidation was measured. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

**Results:** Levels of pro-inflammatory cytokines began to increase after six weeks of a high-fat diet, while those of the anti-inflammatory cytokine adiponectin decreased. Interestingly, the endothelial function and serum nitric oxide began to decrease after six weeks in HFD group. The SBP and lipid peroxidation began to increase at 12 weeks in HFD group. In addition, we showed that total visceral fat mass was negatively correlated with endothelial function and positively correlated with SBP.

**Conclusion:** Our results show the time-course of deleterious effects and their correlation with obesity. (Arq Bras Cardiol. 2018; 110(6):558-567)

**Keywords:** Hypertension; Endothelium / abnormalities; Diet, High-Fat; Nitric Oxide; Dyslipidemias.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Jorge Camargo Oishi •

Rua Rosalino Belline, 455. CEP 13564-050, Santa Paula, São Carlos, SP – Brasil

E-mail: [jorgeoishi@hotmail.com](mailto:jorgeoishi@hotmail.com)

Artigo recebido em 18/07/2017, revisado em 14/09/2017, aceito em 06/10/2017

DOI: 10.5935/abc.20180086

## Introdução

Atualmente, a obesidade e as comorbidades associadas são um dos principais problemas de saúde em países desenvolvidos e em desenvolvimento, reduzindo tanto a qualidade como a expectativa de vida, e aumentando o risco de mortalidade.<sup>1</sup> A obesidade é caracterizada por acúmulo excessivo de tecido adiposo e está fortemente associada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dislipidemia e hipertensão. Existe um meio pró-inflamatório associado à obesidade que parece piorar os desfechos cardiovasculares<sup>2,3</sup> e, segundo a Organização Mundial da Saúde,<sup>4</sup> as doenças cardiovasculares são atualmente uma das principais causas de mortalidade no mundo.

Um grande número de distúrbios metabólicos é causado pela obesidade. Entre eles, a disfunção endotelial exerce um papel importante no desenvolvimento de resistência insulínica e hipertensão.<sup>5</sup> Há quase vinte e cinco anos, descobriu-se que as células endoteliais poderiam modular relaxamentos e contrações da musculatura lisa vascular, apresentando o conceito de que o controle do tônus vascular é dependente do endotélio da musculatura lisa vascular subjacente.<sup>6-8</sup>

O endotélio produz vários fatores de relaxamento (EDRFs, *endothelium-derived relaxing factors*), fatores de hiperpolarização (EDHFs), e fatores de contração (EDCFs). Por meio de um adequado equilíbrio entre a liberação de EDHFs e EDCFs, o endotélio exerce um papel fundamental na manutenção da homeostase circulatória. Qualquer alteração nesse equilíbrio pode resultar em disfunção endotelial.<sup>5,8</sup>

Estudos prévios demonstraram o início de hipertensão e disfunção endotelial na obesidade induzida por dieta hiperlipídica.<sup>9,10</sup> Contudo, se e em qual ordem elas ocorrem não foi bem definido, bem como ainda não foi determinada a relação temporal entre ganho de peso, disfunção endotelial e pressão sanguínea em resposta a uma dieta hiperlipídica. Portanto, o objetivo do presente estudo foi determinar a sequência em que ocorrem a inflamação, a disfunção endotelial, e o aumento da pressão sanguínea após uma dieta hiperlipídica usada para induzir a obesidade.

## Métodos

### Animais e tratamentos dietéticos

O protocolo experimental estava de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos (026/2013).

Setenta ratos machos Wistar com 8 semanas de vida, pesando entre 250 e 300g foram alocados em dois grupos experimentais com comida e água *ad libitum* por 24 semanas – controle (CT, n = 35) que recebeu uma dieta padrão ou DHL (n = 35) que recebeu uma dieta hiperlipídica, que consistiu em uma dieta padrão acrescida de amendoim, chocolate ao leite, e biscoitos em uma proporção de 3:2:2:1 conforme descrito anteriormente.<sup>11</sup> A dieta padrão e a dieta hiperlipídica continham, respectivamente, 20/20% de proteína, 4,5/20% de gordura e 55/40% de carboidrato.<sup>11</sup> Os valores energéticos das dietas foram de aproximadamente 4,07 kcal/g para a

dieta padrão e de 5,12 kcal/g para DHL. No tempo 0 e após cada 6 semanas, 7 ratos do grupo CT e 7 do grupo DHL foram submetidos à eutanásia aleatoriamente, e o sangue foi coletado para análise experimental.

### Medidas de pressão sanguínea em ratos conscientes

A pressão arterial sistólica (PAS) indireta foi medida dois dias antes da eutanásia a cada 6 semanas, utilizando pletismografia de cauda (Power Lab 8/35, AD Instruments, Pty Ltda, CO), conforme descrito por Rodrigues et al.<sup>12</sup> A PAS média foi calculada a partir de quatro (em média) medidas sucessivas realizadas em cada animal.

### Estudos de reatividade vascular

Os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos à eutanásia por decapitação. As aortas foram isoladas e limpas de tecido conjuntivo aderente, e colocadas em solução de Krebs, conforme descrito.<sup>13</sup> As aortas foram seccionadas em anéis ( $\approx 4$  mm de comprimento), colocadas em câmara contendo solução de Krebs a 37°C, aeradas continuamente com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>, pH 7,4 em um miógrafo isométrico (modelo 610 DMT-EUA). O registro foi realizado por um sistema de aquisição de dados PowerLab8/SP (AD Instruments Pty Ltd., Colorado). Os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de 1,5 g, que foi reajustada a cada 15 minutos durante um período de equilíbrio de 60 minutos antes da adição da droga. Os experimentos foram realizados em anéis aórticos com endotélio intacto e também em anéis aórticos desprovidos de endotélio. A integridade endotelial foi avaliada pelo grau de relaxamento induzido por acetilcolina (ACH) a 1  $\mu$ mol/L na presença de tônus contrátil induzido por fenilefrina (0,1  $\mu$ M). Considerava-se que o anel possuía endotélio intacto se o relaxamento com acetilcolina fosse maior que 80%. Em aortas desprovidas de endotélio, o relaxamento com ACH foi menor que 5%. Após o teste de integridade endotelial, os anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina (100 nM). Quando o platô foi alcançado, curvas de concentração-efeito para nitroprussiato de sódio (SNP) doador de óxido nítrico (NO) foram construídas nos anéis aórticos sem endotélio. As curvas de concentração foram ajustadas com uma equação dose-resposta sigmoidal que revelou o efeito máximo (EMax) e o logaritmo negativo do agonista que produz metade da resposta máxima (pD2) usando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, EUA).

### Composição de Gordura Corporal

O tecido adiposo visceral (TAV) foi dissecado (tecido adiposo branco mesentérico, epididimal e retroperitoneal) e pesado para avaliar a adiposidade central.

### Peroxidação lipídica da aorta (oxidação de íon ferroso em xilenol laranja – FOX)

As aortas foram isoladas e limpas de tecido conjuntivo aderente. A metodologia foi descrita por Jiang et al.<sup>14</sup> A oxidação de íon ferroso em xilenol laranja (FOX) mede os peróxidos lipídicos (hidroperóxido de cumeno - HPC), um dos principais produtos da peroxidação lipídica. Para o teste padrão, os seguintes reagentes foram adicionados na sequência: 0,25 mM FeSO<sub>4</sub>, 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 mM xilenol laranja, e água até

completar o volume de 0,9 mL. Uma amostra do extrato de tecido (20-100  $\mu$ L) foi adicionada, e o volume final ajustado a 1 mL com água. Os brancos foram preparados substituindo-se o extrato de tecido por água. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente até o final da reação (40 minutos), e a absorbância a 560 nm foi medida.

### Nitrito e nitrato séricos (NOx)

Os níveis de óxido nítrico sérico foram obtidos medindo-se as concentrações séricas de seus produtos finais estáveis nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), coletivamente conhecidos como NOx, conforme descrito anteriormente.<sup>15</sup> O método de quimioluminescência de NO/ozônio foi realizado utilizando-se o aparelho de análise de NO (NO Analyzer 280i, Sievers, Boulder, CO, EUA).

### Determinação de adiponectina e citocinas inflamatórias

A quantificação de adiponectina e das citocinas inflamatórias – fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e proteína C-reativa (PCR) no soro foi realizada utilizando-se o kit de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). IL-6 e TNF- $\alpha$  foram avaliados utilizando-se kits comerciais OptEIA (BD Biosciences, Pharmingen, EUA). A adiponectina e a PCR foram analisadas utilizando-se kits Duo Set (R&D Systems, EUA). Todos os kits foram usados de acordo com as instruções do fabricante, e os resultados de todas as citocinas avaliadas expressos em pg/mL.

### Avaliação morfológica e histológica

Os segmentos da aorta foram rapidamente limpos de tecidos adjacentes e sangue, cortados em anéis e fixados em formalina 37% e em blocos de parafina. Em seguida, seções de 4  $\mu$ m de espessura foram cortadas com um micrótomo (Leitz 1512, IMEB, EUA), transferidas para lâminas de microscópio e coradas com hematoxilina e eosina usando métodos padrões. Imagens de seções transversais dos segmentos arteriais foram capturadas usando uma câmera conectada a um microscópio ótico (Leica DM 2000). O diâmetro externo (DE) foi obtido medindo-se as superfícies da túnica adventícia e do diâmetro interno (DI) a partir da superfície endotelial. A espessura da camada média foi obtida dividindo-se a diferença (DE - DI) por dois ( $\delta = \text{ED} - \text{ID}/2$ ). A razão camada média/lúmen foi calculada a partir dos dados da área. As imagens foram analisadas utilizando-se o programa ImageJ, conforme descrito anteriormente.<sup>16</sup>

### Análise estatística

A normalidade da distribuição (de todas as variáveis quantitativas e contínuas) foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi necessária uma amostra de 7 animais em cada grupo para conferir um poder estatístico de 85% com um alfa bicaudal de 0,05 para pD2 e de 90% para todas as outras variáveis analisadas neste estudo. As diferenças entre os grupos CT e DHL foram comparadas por análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas. Quando diferenças eram apontadas, a análise

post-hoc de Newman-Keuls foi usada com significância estatística estabelecida em  $p < 0,05$ . Esses dados são expressos em média  $\pm$  DP (programa Statistica 7.0, StatSoft, Inc, EUA). Os dados de reatividade vascular de pD2 e MaxE foram expressos em média  $\pm$  DP com  $p < 0,05$  estabelecido como significância estatística (Graphpad Prism 3.0). A correlação de Pearson foi realizada entre pD2 e a PAS, pD2 e VAT, pressão arterial e VAT, IL-6 e pD2, TNF- $\alpha$  e pD2, CRP e pD2, e entre adiponectina e pD2, com significância estatística de 5%.

## Resultados

### Tecido adiposo visceral total (TAV)

A soma dos pesos dos tecidos adiposos retroperitoneal, visceral e epididimal foi maior no grupo DHL que no grupo CT na sexta semana. Na semana 24, o peso do tecido adiposo foi 300% maior no grupo DHL que no grupo CT. TAV no grupo CT aumentou na semana 12 em comparação à semana 6, mas permaneceu inalterado até o final do experimento (Figura 1).

### Status inflamatório

As citocinas inflamatórias IL-6, TNF- $\alpha$  e PCR estavam aumentadas no soro dos animais do grupo DHL nas semanas 6, 12, 18 e 24 em comparação ao grupo CT (Figuras 2 A, B, C). Por outro lado, os níveis de adiponectina sérica diminuíram no grupo DHL após 6, 12, 18 e 24 semanas de experimento (Figura 2D). No grupo CT, não houve alteração nos níveis de citocina.

### Reatividade vascular

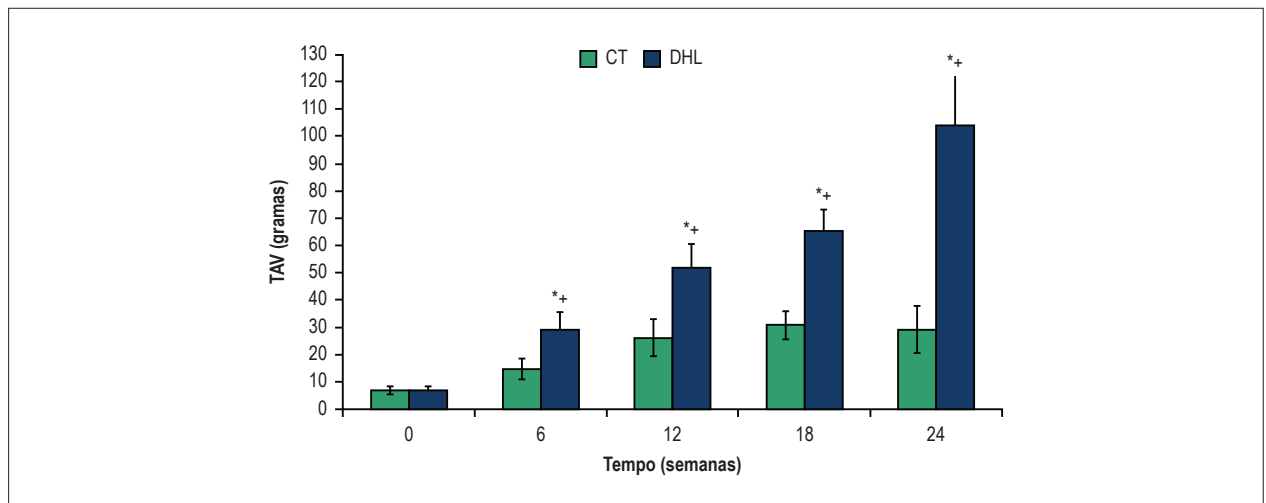
Não houve diferenças no relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina (pD2) no grupo CT durante todo o período de experimento. Por outro lado, pD2 foi deficiente nas aortas dos animais obesos nas semanas 6, 12, 18 e 24 em comparação aos ratos controles. Além disso, observamos uma diminuição no pD2 durante o período experimental no grupo DHL (Figuras 3B, C).

Não foram observadas diferenças no efeito máximo de relaxamento (Emax) nos grupos CT e DHL. Nos anéis aórticos desprovidos de endotélio, não foram observadas diferenças de pD2 ou Emax ao relaxamento independente de endotélio induzido por SNP nos grupos CT e DHL em todas as semanas (Tabela 1).

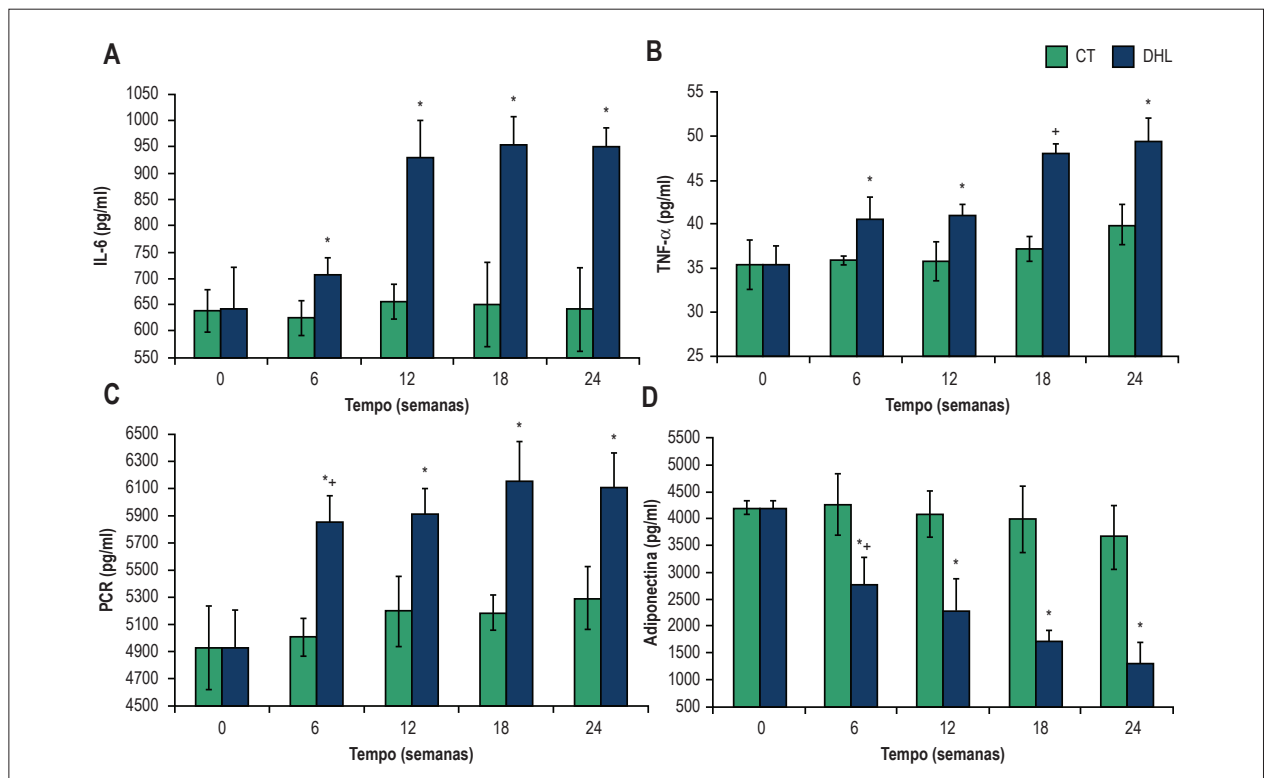
Houve uma forte correlação negativa entre pD2 e PAS ( $r = -0,722$ ,  $p < 0,01$ ). Além disso, encontramos uma correlação negativa entre pD2 e TAV ( $r = -0,729$ ,  $p < 0,01$ ), entre pD2 e citocinas inflamatórias (pD2 e IL-6,  $r = -0,74$ ; pD2 e TNF- $\alpha$ ,  $r = -0,86$ ; pD2 e CRP,  $r = -0,69$ ,  $p < 0,05$ ), e uma correlação positiva entre pD2 e adiponectina ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,01$ ).

### Óxido nítrico sérico (NO) e peroxidação lipídica da aorta

A partir da quantificação dos metabólitos de NO, observamos que os níveis de NO diminuíram na sexta semana nos ratos DHL e permaneceram mais baixos durante o período experimental em comparação ao grupo CT. O tempo de



**Figura 1** – Tecido adiposo visceral (TAV) nos grupos controle (CT) e dieta hiperlipídica (DHL) ao longo das semanas. \* $P < 0,05$ , comparado ao grupo CT; +  $p < 0,05$ , comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas). A cada seis semanas, 7 animais de cada grupo foram avaliados.



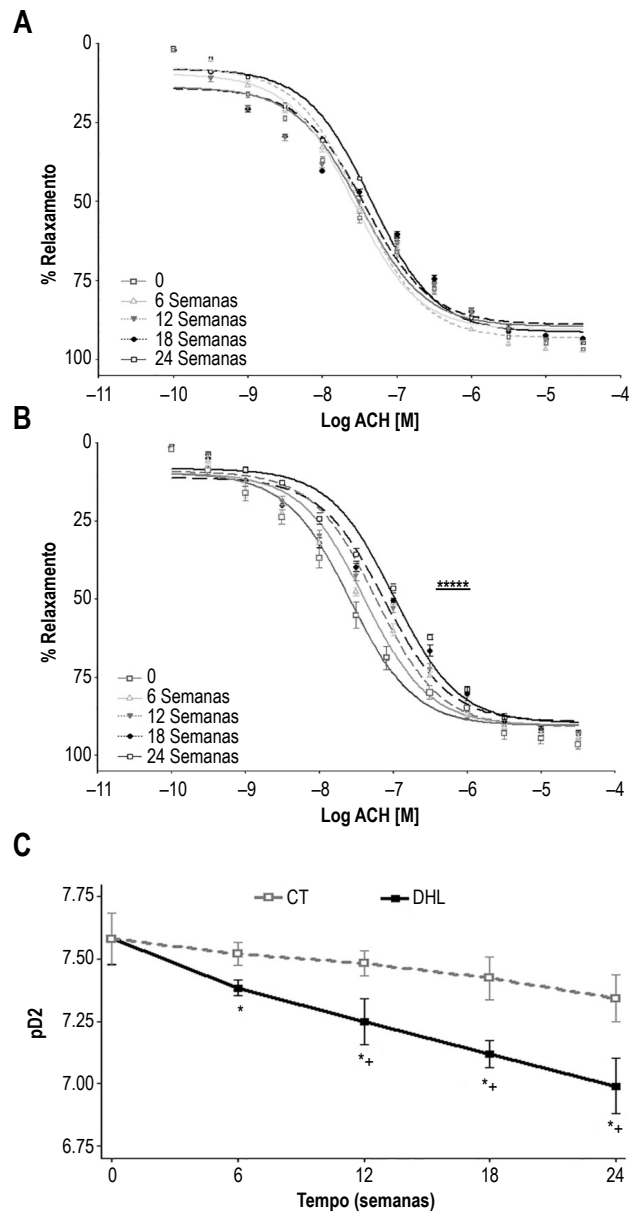
**Figure 2** – Valores séricos das citocinas: IL-6 (A), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (B), proteína C reativa (PCR) (C) e adiponectina (D) nos grupos controle (CT) e dieta hiperlipídica (DHL). \* $P < 0,05$ , comparado ao grupo CT; +  $p < 0,05$ , comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas). A cada seis semanas, 7 animais de cada grupo foram avaliados.

experimento não teve efeito sobre as concentrações de NO nos grupos CT ou DHL (Figura 4).

Os níveis de peroxidação lipídica na aorta aumentaram na 12ª semana de dieta hiperlipídica e permaneceram altos durante o experimento em comparação ao grupo CT. No grupo DHL, houve um aumento na peroxidação lipídica na semana 12 em comparação à semana 6 (Figura 5).

### Pressão arterial sistólica

Como mostrado na Figura 6, a dieta hiperlipídica induziu um aumento na PAS nas semanas 12, 18 e 24 no grupo DHL em comparação ao grupo CT. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre PAS e TAV ( $r = 0,756$ ,  $p < 0,01$ ) no grupo DHL, e não foram observadas diferenças significativas na pressão arterial no grupo CT.



**Figura 3** – Curva concentração-resposta à acetilcolina (relaxamento dependente de endotélio) nos anéis aórticos dos ratos do grupo controle (CT) (A) e grupo dieta hiperlipídica (DHL) (B) e metade da resposta máxima (pD2) em ambos os grupos (C). \* $P < 0,05$ , CT vs. DHL a cada 6 semanas; \*  $p < 0,05$ , comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas). A cada seis semanas, 7 animais de cada grupo foram avaliados.

### Alterações na estrutura vascular

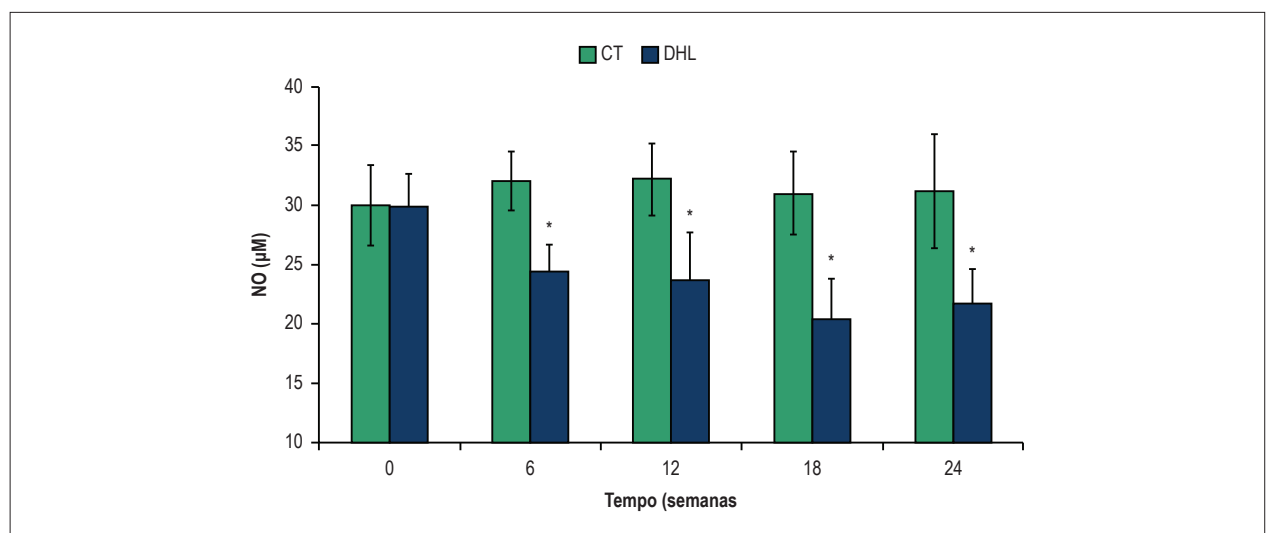
A Tabela 2 mostra que a dieta hiperlipídica induziu um aumento na espessura da camada média da aorta após 18 e 24 semanas e diminuiu o DI após 24 semanas no grupo DHL em comparação ao grupo CT ( $p < 0,05$ ). No grupo DHL, houve um aumento na espessura da camada íntima-média após 18 semanas de dieta hiperlipídica, uma redução no DI após 12 semanas, e um aumento na razão espessura da íntima-média/lúmen na aorta após 18 semanas de dieta hiperlipídica.

### Discussão

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a identificar a ordem de ocorrência de mudanças na função e estrutura vascular, no estresse oxidativo e no status inflamatório durante a progressão da obesidade em um único modelo experimental. Nossos resultados mostraram que a inflamação e a disfunção endotelial precedem o desenvolvimento de hipertensão induzida por dieta hiperlipídica. A progressão da obesidade esteve associada

**Tabela 1** – Metade da resposta máxima (pD2) e efeito máximo (Emax) nos anéis aórticos dos ratos do grupo controle (CT) e grupo dieta hiperlipídica (DHL). \*P < 0,05, CT vs. DHL a cada 6 semanas; + p < 0,05, comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas)

Semanas	Endotélio intacto				Desprovidos de endotélio			
	pD2		Emax(%)		pD2		Emax(%)	
	CT	DHL	CT	DHL	CT	DHL	CT	DHL
0	7,58 ± 0,25	7,58 ± 0,22	90,67 ± 7,40	90,87 ± 7,14	8,69 ± 0,13	8,68 ± 0,23	103,8 ± 2,77	104,6 ± 3,38
6	7,52 ± 0,07	7,37 ± 0,18**	93,42 ± 6,80	90,31 ± 7,64	8,67 ± 0,21	8,66 ± 0,22	98,3 ± 4,10	100,2 ± 7,67
12	7,48 ± 0,18	7,23 ± 0,11**	89,17 ± 8,80	90,90 ± 7,67	8,69 ± 0,10	8,71 ± 0,13	102,5 ± 2,48	103,9 ± 3,43
18	7,42 ± 0,22	7,12 ± 0,15**	88,98 ± 9,90	89,34 ± 10,05	8,71 ± 0,10	8,69 ± 0,07	105,8 ± 3,70	104,3 ± 1,85
24	7,34 ± 0,19	6,99 ± 0,23**	91,46 ± 6,61	89,80 ± 8,59	8,69 ± 0,07	8,68 ± 0,14	105,9 ± 2,98	105,9 ± 2,11

**Figura 4** – Concentração sérica de óxido nítrico (NO) nos ratos do grupo controle (CT) e grupo dieta hiperlipídica (DHL) \*P < 0,05, CT vs. DHL a cada 6 semanas; \* p < 0,05, comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas). A cada seis semanas, 7 animais de cada grupo foram avaliados.

com maior predisposição a condições patológicas e a características comuns dos fatores de risco cardiovasculares, incluindo hipertensão e disfunção endotelial.<sup>17</sup>

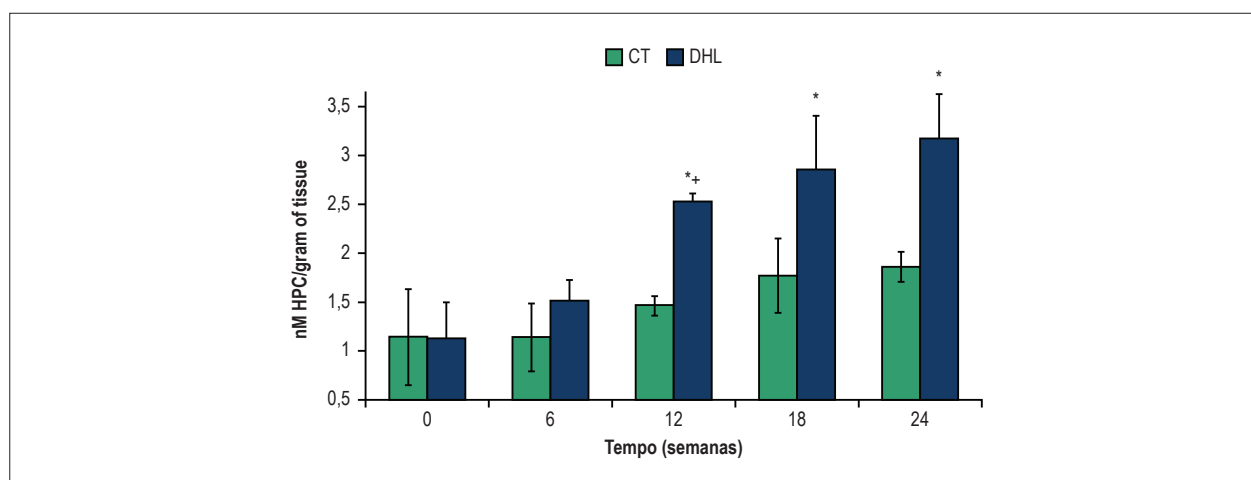
A dieta hiperlipídica utilizada neste estudo induziu mudanças na adiposidade entre grupos CT e DHL, validando nosso modelo experimental. O risco de se desenvolver disfunções relacionadas à obesidade é proporcional ao grau de adiposidade<sup>18</sup> e, particularmente, ao acúmulo de gordura na região visceral.<sup>19</sup> No presente estudo, o grupo DHL apresentou maior massa de TAV nas semanas 6, 12, 18 e 24 que o grupo CT.

O estado inflamatório na obesidade é característico,<sup>19</sup> marcado por uma baixo grau de inflamação, o que resulta na remodelação tecidual e deterioração metabólica sistêmica ao longo do tempo.<sup>20</sup> Assim, identificar o aumento da inflamação na obesidade é importante para o desenvolvimento de intervenção terapêutica.

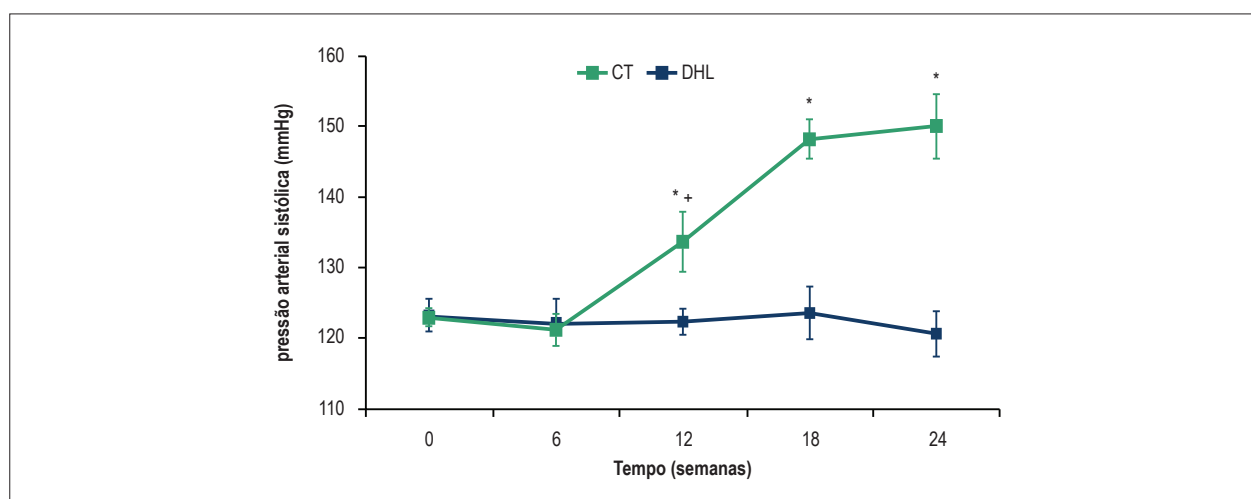
O tecido adiposo é fundamental no desenvolvimento de inflamação ao induzir o aumento de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6,<sup>21</sup> e uma diminuição

nas quimiocinas anti-inflamatórias, como a adiponectina.<sup>22</sup> Além disso, o TNF- $\alpha$  parece contribuir para a elevação de PCR, a qual é um marcador de inflamação de baixo grau, mas também tem uma relação próxima com dislipidemia e disfunção endotelial.<sup>23</sup> Em camundongos, a DHL induziu um aumento no IL-6 após 2, 4 e 6 meses,<sup>24</sup> e nos níveis plasmáticos de mediadores TNF- $\alpha$ , IL-6 após 15 semanas.<sup>25</sup>

No presente estudo, observamos que os níveis de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e PCR aumentaram após 6 semanas no grupo DHL e permaneceram elevados até 24 semanas, enquanto que a concentração de adiponectina diminuiu e permaneceu baixa nesse período. Esses resultados indicam um desenvolvimento precoce de uma inflamação de baixo grau neste modelo animal. O TNF- $\alpha$  está envolvido na resposta inflamatória sistêmica, e seus níveis estão aumentados no tecido adiposo em camundongos obesos em comparação a controles magros.<sup>20</sup> Por outro lado, a adiponectina, que melhora a função cardiovascular e possui efeitos anti-inflamatórios,<sup>22</sup> diminuiu após 6 semanas no grupo DHL e permaneceu mais baixa até a semana 24.



**Figura 5** – Peroxidação lipídica nos anéis aórticos de ratos dos grupos controle (CT) e dieta hiperlipídica (DHL). \* $P < 0,05$ , CT vs. DHL a cada 6 semanas; \*  $p < 0,05$ , comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas). A cada seis semanas, 7 animais de cada grupo foram avaliados. HPC: hidroperóxido de cumeno.



**Figura 6** – Pressão arterial sistólica nos ratos dos grupos controle (CT) e dieta hiperlipídica (DHL) ao longo de 24 semanas. \* $P < 0,05$ , CT vs. DHL a cada 6 semanas; +  $p < 0,05$ , comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas). A cada seis semanas, 7 animais de cada grupo foram avaliados.

A obesidade também está associada com distúrbio na função da célula endotelial e promove disfunção endotelial por meio de desordens metabólicas, incluindo acúmulo de tecido adiposo, hipertensão, dislipidemia e diabetes, os quais estão associados ao estresse oxidativo.<sup>25</sup> O endotélio compreende a camada interna dos vasos sanguíneos, e forma a interface entre o sangue circulante e a parede vascular. Ele também atua como um órgão endócrino e parácrino, que regula a função vascular pela secreção de uma variedade de fatores tróficos e vasoativos que regulam o tônus vascular, adesão celular, proliferação de células musculares lisas e inflamação da parede vascular.<sup>8</sup>

A disfunção endotelial exerce um papel chave no desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares. Na obesidade, muitos fatores podem afetar negativamente a função endotelial, incluindo mudanças na pressão sanguínea, nos níveis glicêmicos, no metabolismo lipídico e

no sistema inflamatório, níveis elevados de ácidos graxos e estresse oxidativo, que, por sua vez, causa uma redução na disponibilidade de NO.<sup>26-28</sup>

Observamos que 6 meses de dieta hiperlipídica foi suficiente para induzir a disfunção endotelial. Ainda, nossos resultados sugerem que um distúrbio no relaxamento à acetilcolina, observado nas aortas de ratos obesos, está relacionado a uma redução na produção de NO. O grupo DHL apresentou as concentrações séricas mais baixas de NO na 6ª semana, que permaneceram baixas até a 24ª semana. Concordantes com nossos achados, vários estudos mostraram uma disfunção endotelial induzida pela obesidade em diferentes momentos de seu desenvolvimento. Boustany-Kari et al.,<sup>29</sup> observaram função endotelial prejudicada em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica durante 11 semanas. Além disso, 16 semanas de uma dieta hiperlipídica em camundongos causou disfunção endotelial e aumento na pressão sistólica nesses animais.<sup>30</sup>

**Tabela 2** – Valores quantitativos obtidos da análise morfométrica da espessura da aorta dos ratos do grupo controle (CT, n = 7) e grupo dieta hiperlipídica (DHL, n = 7). Resultados são expressos em média ± DP. \*P < 0,05, CT vs. DHL a cada 6 semanas; + p < 0,05, comparação intragrupo (0 vs. 6, 6 vs. 12, 12 vs. 18, 18 vs. 24 semanas)

Semanas	Espessura da camada média (µm)		Diâmetro interno (ID) (µm)		Razão camada média:lúmen	
	CT	DHL	CT	DHL	CT	DHL
0	157,99 ± 7,18	157,88 ± 4,75	2830,64 ± 75,20	2832,64 ± 75,98	0,056 ± 0,00	0,056 ± 0,01
6	163,51 ± 7,51	163,64 ± 11,98	2967,21 ± 177,85+	2919,31 ± 145,46	0,054 ± 0,00	0,056 ± 0,00
12	162,82 ± 6,67	164,64 ± 9,64	2976,80 ± 167,73	2876,36 ± 99,89+	0,055 ± 0,01	0,057 ± 0,00
18	161,65 ± 9,95	178,20 ± 5,26 *+	2987,53 ± 156,18	2854,40 ± 133,40	0,054 ± 0,00	0,062 ± 0,00*+
24	164,21 ± 9,51	181,96 ± 9,73 *	3045,25 ± 168,01	2835,53 ± 167,74*	0,054 ± 0,00	0,064 ± 0,01*

Ainda, níveis de TNF- $\alpha$  estão fortemente correlacionados com adiposidade e vasodilatação diminuída em artérias de resistência dos ratos, e níveis de IL-6 são proporcionais à adiposidade, cuja elevação resulta em implicações diretas na função endotelial.<sup>31</sup> Por outro lado, níveis diminuídos de adiponectina estão associados à dislipidemia e a doenças cardiovasculares. Além disso, a adiponectina pode mediar um aumento na produção de NO pela modulação da fosforilação de Ser1177 pela AMPK; já IL-6 e TNF- $\alpha$  diminuem a fosforilação de eNOS Ser1177, resultando em atividade do eNOS diminuída e menos geração de NO.<sup>32</sup>

Encontramos também uma forte correlação entre citocinas inflamatórias – TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP e função endotelial (pD<sub>2</sub>).

Nossos achados são consistentes com a literatura, que mostram que o tratamento com dieta hiperlipídica por 6 semanas foi capaz de aumentar TAV. Um resultado interessante foi a correlação inversa entre TAV e função endotelial (pD<sub>2</sub>). Ainda, os níveis dessas adipocinas estavam alterados na sexta semana no grupo DHL, o que corrobora o conceito da disfunção endotelial relacionada à obesidade. Nós demonstramos neste estudo que esses eventos ocorrem em um estágio precoce do desenvolvimento da obesidade.

A obesidade também está fortemente associada com hipertensão, a qual é um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças coronarianas. De fato, 79% da hipertensão em homens resultou diretamente do excesso de peso.<sup>33</sup> A hipertensão, caracterizada por pressão elevada crônica, tem origem multifatorial, e a disfunção endotelial pode contribuir para sua gênese e manutenção.<sup>5</sup> No presente estudo, a dieta hiperlipídica induziu a um aumento na PAS em 12 semanas, que continuou aumentando até atingir valores máximos em 18 semanas. Esses resultados estão de acordo com Boustany et al.,<sup>34</sup> que observaram um aumento na pressão sanguínea, e na atividade do sistema renina-angiotensina do tecido adiposo e sistêmico após 11 semanas de dieta hiperlipídica nos ratos. O estudo *Framingham Heart Study* descreveu uma forte relação entre os níveis de gordura corporal e pressão sanguínea tanto em homens como em mulheres, e que a adiposidade surgiu como um importante fator que pode ser controlado e que contribui com a hipertensão.<sup>34</sup> O mesmo ocorreu em nosso estudo, que mostrou uma forte correlação entre PAS e TAV.

Outro achado interessante de nosso estudo foi o fato de que alterações estruturais na aorta ocorreram após aumento na pressão sanguínea. Sabe-se que a hipertensão está associada com alterações estruturais nas artérias, que poderiam contribuir para a manutenção da hipertensão.<sup>35</sup> Além disso, a razão camada média/lúmen começou a aumentar (embora de uma maneira não significativa) em 12 semanas, coincidindo com o aumento na pressão sanguínea; esse aumento tornou-se significativo em 18 e 24 semanas. Chen et al.,<sup>36</sup> relataram que a dieta hiperlipídica induziu um aumento na espessura da camada média após 9 semanas. Nossos resultados estão de acordo com esses estudos.

A dieta hiperlipídica também pode induzir a patogênese vascular, incluindo efeitos sobre a aorta, levando a alterações na estrutura vascular. Estudos clínicos e experimentais mostraram que um índice de massa corporal aumentado está frequentemente associado com enrijecimento e aumento na espessura da parede arterial.<sup>37</sup>

Estudos prévios envolvendo animais sugeriram que a hipertensão está associada com formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir de todas as camadas da parede vascular.<sup>38</sup> Em concordância com esses estudos, nossos resultados mostraram um aumento na peroxidação lipídica (usado como marcador de estresse oxidativo) em anéis aórticos, paralelamente ao aumento da PAS, iniciando nas 12 semanas. Além disso, Kobayasi et al.,<sup>30</sup> encontraram uma atividade antioxidante reduzida, inflamação vascular local aumentada, e um relaxamento dependente de endotélio deficiente em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica em 16 semanas. A liberação de IL-6, principalmente a partir de adipócitos abdominais, pode ter um papel fundamental na relação entre estresse oxidativo e disfunção endotelial. IL-6 e TNF- $\alpha$  contribuem para a elevação da PCR, um marcador de estado inflamatório de baixo grau, e estão relacionados com disfunção endotelial.<sup>23</sup>

Conforme mencionado anteriormente, a obesidade é comumente associada com estresse oxidativo,<sup>39</sup> o qual é capaz de modificar o tônus vascular impedindo a disponibilidade e/ou a sinalização de NO.<sup>38</sup> Observamos que a dieta hiperlipídica durante 6 semanas diminuiu os níveis de NO circulante sem efeitos significativos sobre a peroxidação lipídica nesse período de desenvolvimento da obesidade.



Assim, esses resultados sugerem que a diminuição nos níveis de NO antecede o aumento no estresse oxidativo. Durante o estresse oxidativo, a produção excessiva de EROs reduz a bioatividade de NO devido à sua rápida inativação oxidativa pela ERO superóxido (O<sub>2</sub>).<sup>38</sup>

Segundo Victor et al.,<sup>40</sup> enquanto os estoques de gordura visceral se expandem, os adipócitos geram níveis crescentes de EROs. No presente estudo, a dieta hiperlipídica levou ao acúmulo de gordura abdominal que poderia induzir a peroxidação lipídica na aorta em 12 semanas, o que persistiria até 24 semanas.

Uma limitação deste estudo foi o fato de que a massa de gordura visceral foi avaliada por dissecação do tecido adiposo. A absorciometria com raios X de dupla energia (DXA), método padrão ouro para avaliação de gordura corporal, forneceria dados mais completos sobre a composição corporal; mas, infelizmente, o método não pôde ser utilizado neste estudo.

Nossos dados sugerem que mesmo em fases iniciais de desenvolvimento (6 semanas), a obesidade pode gerar inflamação crônica e disfunção endotelial. Tal deficiência parece mais intimamente relacionada com citocinas inflamatórias e expansão do TAV.

### Conclusão

O desenvolvimento da obesidade primeiramente levou a uma diminuição da função endotelial, que continuou a diminuir ao longo das semanas, e à inflamação sistêmica, seguido de um aumento na pressão sanguínea, peroxidação lipídica e mudanças na estrutura aórtica. Nosso estudo é relevante ao mostrar a relação da obesidade com inflamação crônica, disfunção endotelial e hipertensão. Apesar de muitos estudos na área, os resultados encontrados representam um

passo a mais em direção ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para prevenir essas condições.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Obtenção de financiamento: Oishi JC, Duarte ACGO, Rodrigues GJ; Obtenção de dados: Oishi JC, Castro CA, Silva KA, Fabricio V, Cárnio EC, Duarte ACGO, Rodrigues GJ; Análise e interpretação dos dados: Oishi JC, Castro CA, Silva KA, Fabricio V, Cárnio EC, Phillips SA, Duarte ACGO, Rodrigues GJ; Análise estatística: Oishi JC; Redação do manuscrito: Oishi JC, Castro CA, Silva KA, Fabricio V, Duarte ACGO, Rodrigues GJ; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Oishi JC, Castro CA, Silva KA, Cárnio EC, Phillips SA, Duarte ACGO, Rodrigues GJ.

### Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq e parcialmente financiado pela FAPESP.

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Pós-Doutorado de Jorge Camargo Oishi pela Universidade Federal de São Carlos.

### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos sob o número de protocolo 026/2013.

### Referências

1. Belegoli AM, Boersma E, Diniz MD, Lima-Costa MF, Ribeiro AL. 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*. 2012;7(12):e52111. doi: 10.1371/journal.pone.0052111.
2. Field AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird MA, Dietz WH, et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10 year period. *Arch Intern Med*. 2001;161(13):1581-6. doi:10.1001/archinte.161.13.1581.
3. Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, et al. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2014;28(2):169-76. PMID: 25001649.
4. World Health Organization. (WHO) Cardiovascular diseases. [Cited in 2016 Feb 10]. Available from: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en)
5. Davel AP, Wenceslau CF, Akamine EH, Xavier FE, Couto, GK, Oliveira HT, et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. *Braz J Med Biol Res*. 2011;44(9):920-32. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500104>.
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6. PMID: 6253831.
7. Vanhoutte PM. The endothelium—modulator of vascular smooth-muscle tone. *N Engl J Med*. 1988;319(8):512-3. doi: 10.1056/NEJM198808253190809.
8. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3(9):2007-18. PMID: 2545495.
9. Costa RR, Villela NR, Souza MC, Boa BC, Cyrino FZ, Silva SV, et al. High fat diet induces central obesity, insulin resistance and microvascular dysfunction in hamsters. *Microvasc Res*. 2011;82(3):416-22. doi: 10.1016/j.mvr.2011.08.007.
10. Kurtel H, Rodrigues SF, Yilmaz CE, Yildirim A, Granger DN. Impaired vasomotor function induced by combination of hypertension and hypercholesterolemia. *J Am Soc Hypertens*. 2013;7(1):14-23. doi:10.1016/j.jash.2012.11.005.
11. Estadella D, Oyama LM, Bueno AA, Habitante CA, Souza GJ, Ribeiro EB, et al. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. *Lipids Health Dis*. 2011;Sep 23;10:168. doi: 10.1186/1476-511X-10-168.
12. Rodrigues GJ, Pereira AC, Vercesi JA, Lima RC, Silva RS, Bendhack LM. Long-lasting hypotensive effect in renal hypertensive rats induced by nitric oxide released from a ruthenium complex. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;60(2):193-8. doi: 10.1097/FJC.0b013e31825bacc4.

13. Oishi JC, Buzinnari TC, Pestana CR, De Moraes TF, Vatanabe IP, Wink DA, et al. In vitro treatment with cis-[(Ru(H-dcbpy)<sub>2</sub>(Cl)(NO))] improves the endothelial function in aortic rings with endothelial dysfunction. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(5):696-704. PMID: 26670366.
14. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA Assay and a lodometric Method. *Lipids.* 1991;26(10):853-6. PMID: 1795606.
15. Pereira FH, Batalhão ME, Cárnio EV. Correlation between body temperature, blood pressure and plasmatic nitric oxide in septic patients. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2014;22(1):123-8. doi: 10.1590/0104-1169.2896.2392.
16. Coura MA, Pacheco ME, Simões HF, Moraes JF, Campbell CS. Estudo morfoquantitativo da parede da aorta de ratos wistar idosos treinados com exercício aeróbio. *Motri.* 2012;8(4):71-9. doi: [http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.8\(4\).1554](http://dx.doi.org/10.6063/motricidade.8(4).1554).
17. Huang PL. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(6):295-302. doi: 10.1016/j.tem.2009.03.005.
18. Gomez-Ambrosi J, Silva C, Galofre JC, Escalada J, Santos S, Millán D, et al. Body mass index classification misses subjects with increased cardiometabolic risk factors related to elevated adiposity. *Int J Obes. (Lond).* 2012;36(2):286-94. doi: 10.1038/ijo.2011.100.
19. Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013;93(1):359-404. doi: 10.1152/physrev.00033.2011.
20. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
21. Jung UJ, Choi MS. Obesity and Its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *J Mol Sci.* 2014;15(4):6184-223. doi:10.3390/ijms15046184.
22. Li FY, Lam KS, Xu A. Therapeutic perspectives for adiponectin: an update. *Curr Med Chem.* 2012;19(32):5513-23. doi: 10.2174/092986712803833173.
23. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444(7121):875-80. doi: 10.1038/nature05487.
24. Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One.* 2012;7(7):e39837. doi: 10.1371/journal.pone.0039837.
25. Carvalho KM, Marinho Filho JD, de Melo TS, Araújo AJ, Quetz Jda S, da Cunha Mdo P, et al. The resin from protium heptaphyllum prevents high-fat diet-induced obesity in mice: scientific evidence and potential mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:106157. doi: 10.1155/2015/106157.
26. Chantemele EJ, Stepp DW. Influence of obesity and metabolic dysfunction on the endothelial control in the coronary circulation. *Mol Cell Cardiol.* 2012;52(4):840-7. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.08.018.
27. Bray GA. Medical consequence of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2583-9. doi: 10.1210/jc.2004-0535.
28. De Kreutzenberg SV, Crepaldi C, Marchetto S, Calò L, Tiengo A, Del Prato S, et al. Plasma free fatty acids and endothelium-dependent vasodilation: effect of chain-length and cyclooxygenase inhibition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(2):793-8. doi: 10.1210/jcem.85.2.6352.
29. Boustany-Kary CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond).* 2007;31(11):1652-9. doi: 10.1038/sj.ijo.0803426.
30. Kobayashi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens.* 2010;28(10):2111-9. doi: 10.1097/HJH.0b013e32833ca68c.
31. Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, Frisbee JC. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology.* 2008;15(2):79-89. doi: 10.1016/j.pathophys.2008.04.007.
32. Prieto D, Contreras C, Sánchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(3):412-26. doi: 10.2174/1570161112666140423221008.
33. Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J 3rd, Castelli WP. Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study. *Prev Med.* 1987;16(2):235-51. doi: [https://doi.org/10.1016/0091-7435\(87\)90087-9](https://doi.org/10.1016/0091-7435(87)90087-9).
34. Boustany CN, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4):R943-9. doi: 10.1152/ajpregu.00265.2004.
35. Arribas SM, Hinek A, Gonzalez MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther.* 2006;111(3):771-91. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.12.003.
36. Chen J, Wang S, Luo M, Zhang Z, Dai X, Kong M, et al. Zinc deficiency worsens and supplementation prevents high-fat diet induced vascular inflammation, oxidative stress, and pathological remodeling. *Toxicol Sci.* 2016;153(1):124-36. doi: 10.1093/toxsci/kfw110.
37. Martínez-Martínez E, Miana M, Jurado-López R, Bartolomé MV, Souza Neto FV, Salaices M, et al. The potential role of leptin in the vascular remodeling associated with obesity. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(12):1565-72. doi: 10.1038/ijo.2014.37.
38. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34(6):665-73. doi:10.1038/hr.2011.39
39. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes. Metab.* 2007;9(6):813-39. doi: 10.1111/j.1463-1326.2007.00692.x.
40. Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Rocha M. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. *Curr Med Chem.* 2009;16(35):4654-67. doi: 10.2174/092986709789878265.

