

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ASSOCIADO EM
EDUCAÇÃO FÍSICA – UEM/UEL

FERNANDA CHAGAS BUENO

**EFEITO DA PROSTAGLANDINA E1 (PGE1)
NA GÊNESE DE CAPILARES SANGUÍNEOS
EM MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÊMICO
DE RATOS OBESOS**

Maringá
2012

FERNANDA CHAGAS BUENO

**EFEITO DA PROSTAGLANDINA E1 (PGE1)
NA GÊNESE DE CAPILARES SANGUÍNEOS
EM MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÊMICO
DE RATOS OBESOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Associado em Educação
Física – UEM/UEL, para obtenção do
título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dra. Solange Marta Franzói de Moraes

Maringá
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B928e Bueno, Fernanda Chagas
Efeitos da prostaglandina E1 (PGE1) na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos obesos / Fernanda Chagas Bueno. -- Maringá, 2012. 52 f. : il. (algumas color.)

Orientador: Prof.a Dr.a Solange Marta Franzói de Moraes. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, 2012.

1. Obesidade. 2. Doenças vasculares. 3. Prostaglandina. 4. Terapia angiogênica. I. Moraes, Solange Marta Franzói de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. 616.1
masa-001653

FERNANDA CHAGAS BUENO

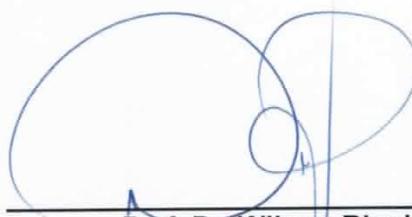
**EFEITO DA PROSTAGLANDINA E1 (PGE1)
NA GÊNESE DE CAPILARES
SANGUÍNEOS EM MÚSCULO
ESQUELÉTICO ISQUÊMICO DE RATOS
OBESOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Associado em Educação Física – UEM/UEL, na área de concentração em Biodinâmica do Movimento Humano, para obtenção do título de Mestre.

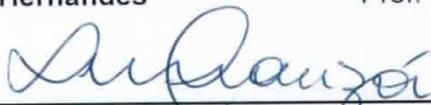
APROVADA em 11 de julho de 2012.



Profa. Dra. **Luzmarina Hernandes**



Prof. Dr. **Wilson Rinaldi**



Profa. Dra. **Solange Marta Franzoi de Moraes**
(Orientadora)

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, minha família e amigos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me dado força para chegar até aqui.

A minha mãe Marli e minhas irmãs Giselle e Geovana pela torcida.

Ao meu marido Humberto por estar ao meu lado em tempos difíceis.

À minha orientadora Solange Marta Franzói de Moraes pela confiança e paciência.

À professora Luzmarina Hernandez e ao professor Dorival Moreschi pelo tempo e conhecimento dedicado a essa pesquisa.

Aos meus queridos amigos e ajudantes Giselle, Maynara, Lidyane, Gustavo, Camila, Ariela, Renan, Danilo, Valéria, Elizete e Fernanda Losi, as técnicas da histologia Eurides e Dos Anjos os quais sem eles não teria conseguido chegar até aqui..

Ao pessoal da UNINGÁ e minha chefe Emília pela compreensão.

BUENO, Fernanda Chagas. **Efeitos da Prostaglandina E₁ (PGE1) na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos obesos**. 2012. 52 f. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

RESUMO

Vários estudos epidemiológicos demonstram que a obesidade aumenta significativamente o risco de morbidade e mortalidade em função de alterações cardiovasculares. O número de pacientes com artérias periféricas severamente doentes que não podem ser eficazmente tratados com as técnicas de revascularização atuais aumentou, e por causa da isquemia grave perdem o membro, assim afetando negativamente a qualidade de vida desses indivíduos. A terapia angiogênica é uma técnica promissora que demonstra que fatores de crescimento são capazes de aumentar a densidade capilar, podendo ser essa técnica utilizada para reduzir o impacto da isquemia em pacientes que não tiveram uma resposta satisfatória ao tratamento clínico convencional. Numerosas substâncias tem a habilidade de intensificar o processo de angiogênese para compensar a isquemia do tecido, entre as drogas utilizadas para essa finalidade está a prostaglandina E₁ (PGE1), um vasodilatador que aumenta a perfusão periférica de sangue e melhora a função endotelial. Portanto, o objetivo do nosso estudo é analisar a gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético do membro caudal de ratos obesos e controle, submetidos à isquemia e sobre a ação da PGE1 administrada por via intramuscular. Foram utilizados 57 ratos, linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente em dois grupos, obesidade e controle, redistribuídos em dois subgrupos, isquemia (I) e isquemia com injeção intramuscular de PGE1 (I+PGE), novamente redistribuídos em dois subgrupos, 14 e 28 dias de observação. Para a análise dos resultados, foram utilizadas técnicas histológicas de coloração com hematoxilina e eosina (HE) e imunohistoquímica. Variáveis antropométricas (peso corporal e adiposidade) e perfil lipídico foram analisados. Os resultados demonstram um aumento estatisticamente significativo no número de capilares (I+PGE 28 dias $10,2 \pm 1,28$ vs. I 28 dias $7,2 \pm 0,3$ e I+PGE 14 dias $9,3 \pm 0,3$ vs. I 14 dias $5,5 \pm 0,5$) e razão capilar/fibra muscular ($1,70 \pm 0,10$ I + PGE vs. $0,93 \pm 0,06$ I) no grupo obesidade com aplicação intramuscular de PGE1 aos 28 dias de observação. Na técnica de imunohistoquímica com os anticorpos primários, anti-VEGF para detecção do receptor-3 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) foram identificadas marcações determinando a positividade da reação. Pode-se concluir que a terapia angiogênica induziu um aumento no número de capilares e conseqüente pode ter melhorado o fluxo sanguíneo no nosso modelo experimental, porém estudos clínicos em seres humanos necessitam ser realizados para atestar esta efetividade.

Palavras-Chave: Obesidade. Doenças Vasculares. Prostaglandina. Terapia Angiogênica.

BUENO, Fernanda Chagas. **Effects of Prostaglandin E₁ (PGE₁) in the genesis of blood capillaries in obese rat ischemic skeletal muscle**. 2012. 52 f. Dissertation (Master Program in Physical Education) – Center for Health Sciences. State University of Maringá, Maringá, 2012.

ABSTRACT

Several epidemiological studies show that obesity increases the risk of morbidity and mortality due to cardiovascular diseases. The number of patients with peripheral vascular diseases who can not be effectively treated with modern revascularization techniques has increased. As a consequence, severe ischemia, mainly on lower limbs develops, adversely affecting the quality of life for these patients. The angiogenic therapy is a promising technique that demonstrates that growth factors are able to increase capillary density. This technique is currently used to reduce the impact of ischemia in patients who have not had a satisfactory response to conventional treatments. Numerous substances have the ability to intensify the process of angiogenesis to compensate for tissue ischemia. Among the drugs used for this purpose is prostaglandin E₁ (PGE₁), a vasodilator that increases blood perfusion and improves peripheral endothelial function. Therefore, the aim of our study was to analyze the formation of new blood capillaries in skeletal muscle lower limb of obese rats, subjected to ischemia and/or the action of PGE₁ administered intramuscularly. For this purpose, we used 57 Wistar rats were randomly divided into two groups, obesity and control, subsequently redistributed into two subgroups, ischemia (I) and ischemia with an intramuscular injection of PGE₁ (I + PGE). Finally, the two groups were subdivided in 14 and 28 days of observation. To analyze the results, we used histological techniques with hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemistry. Anthropometric variables (body weight and adiposity) and lipid profile were analyzed. The results demonstrate a significant increase in the number of capillaries (PGE I + R 28 days 10.2 ± 2.0 vs. 7.2 ± 0.3 and 14 days PGE I + 9.3 ± 0.3 vs. I 14 days 5.5 ± 0.5) and capillary/muscle fiber ratio (1.70 ± 0.10 vs R + PGE. I 0.93 ± 0.06) in the obesity group with intramuscular injection of PGE₁ at 28 days of observation. Immunohistochemistry using anti-VEGF-3 receptor were identified as positive markers of the reaction. Taken together, our data shows that angiogenic therapy induced an increase in the number of capillaries and consequent improve in blood flow in our experimental model, although in humans clinical trials should be carried out in order to demonstrate this effectiveness.

Keywords: Obesity. Vascular Diseases. Prostaglandin. Angiogenic Therapy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Figura ilustrativa mostrando o ciclo vicioso da incapacidade física provoca pelas doenças arteriais periféricas, envolvendo a obesidade e dislipidemia na gênese da doença. 21
- Figura 2 -** Figura ilustrativa do processo de angiogênese e vasculogênese mediado por isquemia e fatores angiogênicos. 24
- Figura 3 -** Fotografias da região medial do membro caudal de rato, após incisão da pele e tela subcutânea (A), mostrando a disposição do feixe vâsculo-nervoso com destaque para artéria femoral isolada e dissecada em toda sua extensão (B), aplicação de injeção intramuscular de PGE1 (C) e fechamento da incisão cirúrgica (D). 28
- Figura 4 -** Fotografia mostrando a peça retirada para o procedimento histológico do membro caudal isquêmico, contendo tecido muscular e o feixe vâsculo-nervoso sem a artéria femoral. 30
- Figura 5 -** Número de capilares quantificados por cortes histológicos corados com técnica de Hematoxilina Eosina (HE) para animais controles (A) e obesos (B) avaliados aos 14 e 28 dias após procedimento de isquemia ou isquemia com injeção de prostaglandina E1. Valores mostram médias \pm EPM de 4 a 6 animais por grupo, * $P < 0,05$ em relação ao grupo obeso isquemia, # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle isquemia + PGE1. 35
- Figura 6 -** Fotomicrografias do músculo esquelético isquêmico do membro caudal direito de ratos. Observado a distribuição de capilares sanguíneos ao redor das fibras musculares em animal obeso tratado com PGE1 observado por (A) 14 dias após tratamento (B) 28 dias após tratamento e (C) em animais controle tratados com PGE1 observados por 28 dias. 36
- Figura 7 -** Área da fibra muscular de membro caudal isquêmico de animais controles (A) e obesos (B) avaliados aos 14 e 28 dias por técnica de Hematoxilina Eosina (HE) após procedimento de isquemia ou isquemia com injeção de prostaglandina E1. Valores mostram médias \pm EPM de 4 a 6 animais por grupo, * $P < 0,05$ em relação aos grupos obesos, # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle isquemia. 38
- Figura 8 -** Razão capilar/ fibra muscular de membro caudal isquêmico de animais controle (A) e obesos (B) avaliados aos 14 e 28 dias pós técnica de hematoxilina e eosina (HE) após procedimento de 39

isquemia ou isquemia com injeção de prostaglandina E1. Valores mostram médias \pm EPM de 4 a 6 animais por grupo, * $P < 0,05$ em relação aos grupos obesos e # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle I + PGE1 28 dias.

Figura 9 - Fotomicrografia do músculo isquêmico de rato (A) obesos e (B) magro. As setas indicam capilares imunocorados com VEGF entre as fibras musculares. (*) representa uma vênula com hemáceas. Aumento original: 100x 40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tipo de indução alimentar, tipo de tratamento submetido e período que o animal foi morto após o tratamento aplicado.	27
-------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição semanal dos alimentos oferecidos aos animais participantes do grupo induzido a obesidade por dieta hipercalórica (cafeteria).	26
Tabela 2 -	Comparação das variáveis antropométricas, adiposidade e variáveis plasmáticas de ratos com obesidade induzidos por dieta de cafeteria e ratos controle, alimentados com dieta padrão que tiveram o membro caudal direito isquêmico e receberam prostaglandina E1 intramuscular ou foram submetidos à isquemia e não receberam tratamento. Os animais foram mortos aos 14 ou 28 dias após o procedimento de isquemia.	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CACS	Células angiogênicas
CE	Células endoteliais
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DM₂	Diabetes melito tipo 2
DAP	Doença arterial periférica
FGF	Fator de crescimento do Fibroblasto
IMC	Índice de Massa Corporal
IM	Intramuscular
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
MCP1	Proteína Quimiotática do Monócito
PD - ECGF	Fator de Crescimento da Célula Endotelial derivado de Plaquetas
PG	Prostaglandina
PGE1	Prostaglandina E1
PO	Pós-operatório
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Obesidade	17
3.2 Obesidade e doenças vasculares	20
3.3 Prostaglandinas e terapia angiogênica	22
4 MÉTODOS	25
4.1 Amostra	25
4.2 Tipo de dieta dos animais	25
4.3 Grupos experimentais	26
4.4 Procedimentos de indução da isquemia	27
4.4.1 Aplicação de Prostaglandina E ₁ após isquemia	29
4.5 Dados de observação	29
4.6 Eutanásia e coleta dos tecidos	29
4.7 Estudo Histomorfométrico.....	30
4.8 Determinação do número de capilares sanguíneos	31
4.9 Reação imunohistoquímica.....	31
4.10 Avaliação das dosagens plasmáticas.....	32
4.11 Análise estatística	32
5 RESULTADOS	33
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A obesidade altera a reatividade vascular, o desenvolvimento da circulação colateral e a estrutura da parede dos vasos, favorecendo o estado de inflamação crônica e contribuindo para as alterações na função vascular, tornando-se assim um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovascular (STAPLETON et al., 2008). Há relato que a adiponectina, uma citocina produzida pelos adipócitos, age como um modulador biológico importante da remodelação vascular, com propriedades antiaterogênia e antidiabética (PANDYA; DHALLA; SANTANI, 2006). O mesmo estudo destaca que existem evidências *in vivo* de que a adiponectina tem um papel importante no processo de angiogênese induzida pela isquemia, por sua ação direta no endotélio vascular.

A obesidade contribui para o desenvolvimento da síndrome metabólica e do diabetes tipo II, condições que são associadas com a diminuição da microcirculação e redução do desenvolvimento de circulação colateral em tecidos isquêmicos (SHIBATA et al., 2004).

Estima-se que 80% das amputações dos membros inferiores são de causa vascular periférica devido a formação de placa arteriosclerótica, e que o risco de amputação do membros contra-lateral ou óbito em cinco anos chegue a 50% dos pacientes. Entre estes pacientes portadores de doenças arterioscleróticas, a obesidade se destaca por ser um fator de risco para o desenvolvimento desta doença, diretamente, devido a hipercolesterolemia, e indiretamente devido a produção de citocinas que favorecem a lesão endotelial considerados fatores participantes da fisiologia da formação arterioesclerótica.

Como muitos pacientes portadores de doença vascular periférica não são candidatos a uma revascularização direta, com riscos elevados de perda de membros (amputação), o surgimento de maneiras que estimulem e mantenham a neoformação vascular, teria um impacto na vida social destes indivíduos por mantê-los de forma produtiva na sociedade.

Entre as substâncias utilizadas para promover a angiogênese está a Prostaglandina E1 (PGE1), uma substância endógena com alta atividade biológica, com poder vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária (CLOVER; MCCARTHY, 2003; CHAE et al., 2000; FOLKMAN; SHING, 1992; MEHRABI et al., 2001). A PGE1 promove vasodilatação direta e age na ativação da fibrinólise, na modulação da proliferação celular, na fibrinogênese, na antiagregação plaquetária, na atividade hemorreológica sobre o eritrócito, na inibição e a na ativação de neutrófilos e na melhora da utilização do oxigênio e da glicose pelos tecidos (MEHRABI et al., 2001; PACHER, 1997).

Além destes efeitos, há evidências de que a PGE1 estimula a angiogênese em situações de isquemia miocárdica (MEHRABI et al., 2003; MEHRABI et al., 2002; MEHRABI et al., 2001). Em situações de isquemia periférica, seja aguda ou crônica, ainda não há relatos de estudos experimentais ou clínicos, utilizando a PGE1.

A prostaglandina E₁, já empregada na prática clínica por sua ação vasodilatadora, como uma droga indutora da angiogênese, através de uma via de administração factível, diminuindo a necessidade de intervenções cirúrgicas nesses pacientes e aumentando a sobrevida de forma produtiva dos mesmos.

Em ratos demonstrou-se que a PGE1 administrada por via intramuscular ou endovenosa promoveu, em músculos esqueléticos de ratos submetidos à isquemia, o aumento no número de capilares, identificáveis histologicamente e imunohistoquimicamente, após 14 dias de observação e também o aparecimento de estruturas morfológicas, identificáveis por microscopia eletrônica de transmissão, compatíveis com o fenômeno de angiogênese e vasculogênese ((VIDIGAL, 2005; TERUYA, 2005);, MORESCHI et al., 2007).

Assim, baseado em experiência anterior em modelos de isquemia, e a oportunidade de aplicá-la em ratos obesos, uma vez que a obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças vasculares, a proposta desta pesquisa foi a de verificar o papel da PGE1 como estimuladora ou moduladora dos processos de angiogênese na musculatura esquelética de membros caudais de ratos obesos submetidos a um modelo de isquemia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar a ação da Prostagandina E₁ sobre a gênese de capilares sanguíneos em membro caudal isquêmico de ratos obesos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar e comparar os animais dos grupos obesidade e controle através das variáveis antropométricas (peso corporal e adiposidade) e plasmáticas (glicose, colesterol e triglicerídeos).
- Comparar o número de capilares e área da fibra muscular do membro caudal isquêmico entre os grupos obesidade e controle, submetidos às diferentes formas e período de tratamento.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Obesidade

Pela primeira vez na história da humanidade o número de pessoas com excesso de peso ultrapassou o de pessoas com desnutrição, passando de um bilhão e cem milhões de pessoas acima do peso em todo o mundo. A obesidade é considerada atualmente uma epidemia global e um importante problema de saúde pública em todos os países industrializados, desenvolvidos e em desenvolvimento (GOMES et al., 2010). Nesses países, estima-se que 1/3 da população tem obesidade grave que requer tratamento para evitar o aparecimento de doenças e complicações (SEIDEL et al., 2011).

Acredita-se que 1 milhão de pessoas no mundo apresentam sobrepeso ou obesidade (YANOVSKI; YANOVSKI, 2011), a mesma pode ser definida como um distúrbio da homeostasia energética, gerando um acúmulo excessivo de tecido adiposo (MENEZES, 2010). O conteúdo de tecido adiposo que caracteriza a obesidade pode ser avaliado de forma indireta em indivíduos adultos por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), um indicador que utiliza o peso corporal em quilogramas dividido pelo quadrado da altura, em adultos, um IMC igual ou maior que 30 Kg/m² o que caracteriza a obesidade (GOULARTE, 2011).

A obesidade é uma síndrome de etiologia multifatorial que apresenta causas que estão sendo exaustivamente estudadas por pesquisadores em indústrias farmacêuticas e centros de pesquisas em universidades em todo o mundo. Mas tudo indica que o grande número de casos de obesidade, parece ser resultado de mudanças nos alimentos, nos hábitos alimentares e nos níveis de atividade física (MENEZES, 2010 e GOULARTE, 2011).

Dados recentes apontam que desde 1970 a indústria alimentícia vem realizando modificações nos alimentos, resultando no aumento gradativo nos tamanhos das porções de alimentos comercializados em supermercados, restaurantes e “*fast-foods*”.

A frequência de realização das refeições em “*fast-foods*” tem sido associada de forma positiva com maiores níveis de IMC e do risco de ganho de peso em adultos e crianças. Os alimentos consumidos fora de casa tendem a possuir maiores valores energéticos e maiores quantidades de lipídios, carboidratos, açúcares e sódio, com menor consumo de frutas, cereais e vegetais. Além disso, as modificações na sociedade moderna que tiveram início na metade do século 20 parecem contribuir para os menores níveis de atividade física e o comportamento sedentário que parecem estar associados ao desenvolvimento de sobrepeso e obesidade (GOULARTE, 2011).

A exposição a dietas ricas em gorduras e carboidratos similares aquelas dos “fast foods” (dieta de cafeteria), por períodos prolongados, resultam em balanço energético positivo, obesidade e resistência à insulina em humanos (ALMEIDA et al., 2008). O grupo de pesquisa de Fisiologia do Esforço do Departamento de Fisiologia da Universidade Estadual de Maringá tem demonstrado que em modelos experimentais com roedores, dietas com alto teor de gorduras e carboidratos têm efeitos similares.

A crescente prevalência de obesidade no mundo tem levado os pesquisadores a buscarem esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos no controle do peso corporal, como estudos controlados e de longo prazo com humanos são difíceis de ser realizado, o uso de modelos animais que reproduzam as características de humanos obesos é de extrema importância tanto para elucidar os mecanismos fisiopatológicos quanto para a busca de tratamentos preventivos e curativos para a obesidade e suas complicações (GOULARTE, 2011).

A grande similaridade e homologia entre os genomas dos roedores e dos seres humanos tornam esses animais uma importante ferramenta para estudar a obesidade, pois permitem obter respostas em um curto espaço de tempo, dez dias da vida de um rato são aproximadamente um ano em humanos (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

Alguns modelos de indução da obesidade em ratos são encontrados na literatura, a característica comumente observada entre eles é o aumento da ingestão alimentar que podem ser provocadas por lesões cerebrais de áreas hipotalâmicas, envolvidas no controle da ingestão alimentar, como a região ventromedial, por meio de estimulação elétrica ou provocada por lesão química por aplicação de drogas

específicas na região, como o glutamato monossódico, indução de obesidade por mutação genética, ou modelos de “*hight-fat diet*” ou hipercalórica, (MENEZES, 2010 e GOULARTE, 2011), este é o modelo mais simples de indução da obesidade e possivelmente aquele que mais se assemelha à realidade da obesidade em humanos (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

Dentro das opções das dietas hipercalóricas, existe um modelo experimental muito vantajoso, por provocar uma obesidade semelhante à humana, que é induzida por uma dieta altamente palatável constituída por alimentos que fazem parte dos hábitos alimentares humanos ocidentais, densos em energia, ricos em sódio e gordura saturada e pobre em fibras, conhecido como dieta de cafeteria (MENEZES, 2010).

Esta dieta é fornecida juntamente com a ração padrão de biotério e baseia-se em uma escolha à vontade de alimentos processados que possuem uma elevada quantidade de gordura e/ou carboidratos, o que a torna altamente calórica. Os alimentos empregados em adição à ração variam entre os estudos, mas observa-se a utilização de pão branco, queijo, chocolate, gordura animal, pipoca, cubos de açúcar, marmelada, salame, presunto, marshmallow, entre outros. A exposição à dieta pode ter início 7 dias após o parto, aos 21 dias de idade ou quando adultos. Em geral, a duração do modelo de dieta de cafeteria varia entre 3 a 8 semanas, embora duração maior que 5 meses tenha sido descrita na literatura. Entre as consequências do acesso *ad libitum* aos alimentos hipercalóricos e ricos em carboidratos refinados e gordura saturada então o padrão alimentar hiperfágico e hipercalórico, ganho de peso corporal e aumento excessivo da massa de tecido adiposo e alterações metabólicas semelhantes as que acontecem em humanos obesos (GOULARTE, 2011).

O aumento de obesidade entre a população humana causa profundas consequências econômicas em relação a custos médicos diretos e indiretos, por estar associada com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças que diminuem a qualidade e a expectativa de vida, podendo levar à morte prematura. Dentre as doenças mais comumente citadas ocasionadas pela obesidade podemos destacar o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), piora da função reprodutiva, alterações do perfil lipídico, aumento dos níveis pressóricos, cânceres e doenças cardiovasculares (MENEZES, 2010).

3.2. Obesidade e doenças vasculares

A associação da obesidade com fatores de risco clássicos para doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, diabetes melito, dislipidemias e síndrome metabólica, é conhecida há bastante tempo. Porém, o conhecimento mais recente de que, mesmo após o controle dessas doenças associadas, o risco de eventos cardiovasculares permanece elevado, fez com que hoje em dia se considere a obesidade como fator de risco cardiovascular independente (GOMES et al., 2010).

As doenças cardiovasculares representam um termo amplo que inclui várias doenças cardíacas e vasculares mais específicas, dentre elas podemos citar a doença arterial periférica (DAP), no Brasil atinge quase 10,5% da população geral sendo mais prevalente em idosos e geralmente ocorre em indivíduos que já apresentam outras doenças crônicas estabelecidas tais como hipertensão Arterial, diabetes melito, dislipidemias, obesidade e cardiopatia. A doença arterial periférica é causada por lesões ateroscleróticas que diminuem o fluxo sanguíneo nos tecidos distais à estenose arterial gerando isquemia, sendo mais comumente observada nos membros inferiores (BARBOSA et al., 2011).

A gravidade da doença é caracterizada pelas limitações que a isquemia causa na vida diária do doente. Se ela só se manifesta com esforços maiores do que os quotidianos, não são considerados incapacitantes; quando impede as tarefas diárias, é considerada incapacitante. Devem, ainda, considerar-se as limitações sobre as atividades profissionais e dos tempos livres, assim como sobre aspectos potencialmente mais exigentes da vida diária. A sintomatologia pode variar entre queixas de dor até quadros mais graves de úlceras e gangrenas. A terapêutica da doença arterial periférica pode ser genericamente dividida em dois grandes grupos. O primeiro engloba as medidas preventivas e corretivas dos fatores de risco e o segundo a terapêutica farmacológica e cirúrgica (FERREIRA; BARROSO; DUARTE, 2010).



Figura 01. Figura ilustrativa mostrando o ciclo vicioso da incapacidade física provocada pelas doenças arteriais periféricas, envolvendo a obesidade e dislipidemia na gênese da doença.

Muitos pacientes com doença arterial periférica crônica com comprometimento do leito arterial primitivo não apresentam resposta satisfatória ao tratamento clínico medicamentoso e comumente não apresentam condições clínico cirúrgicas para alternativa operatória de revascularização direta ou angioplastia. O tratamento nessas condições é normalmente paliativo e com resultados limitados. Nesses casos, uma opção terapêutica seria a estimulação artificial da neoformação vascular pelo próprio organismo, a angiogênese, para compensar o território vascular comprometido (MORESCHI et al., 2007).

Mais recentemente, têm surgido na literatura estudos experimentais e clínicos envolvendo o estímulo à angiogênese, arteriogênese, vasculogênese como alternativa para esses casos. A vasculogênese foi definida como formação de novos vasos sanguíneos *in situ*, em local onde não há vasos, a angiogênese foi estabelecida como brotamento de novos vasos a partir de células endoteliais (CE) diferenciadas de um vaso pré-existente e a arteriogênese é um processo mais conhecido dos cirurgiões

vasculares, que consiste em desenvolvimento de circulação colateral, tendo como precursoras as anastomoses vasculares pré-existentes (YOSHIDA, 2005).

Angiogênese, juntamente com arteriogênese e vasculogênese é um processo fundamental no reparo da isquêmica em animais adultos, incluindo os seres humanos. A hipóxia induzida por fator 1 (HIF-1) desempenha um papel central na mediação de respostas adaptativas à isquemia, expressando citocinas angiogênicas e fatores de crescimento. Esses fatores de crescimento angiogênicos são o sinal para fazer circular as células angiogênicas (CACs), que são mobilizadas da medula óssea para o sangue e recruta-las para os tecidos alvo para promover a vascularização (SARKAR; SEMENZA, 2011).

Dessa maneira, promover a neovascularização em tecidos isquêmicos é uma estratégia promissora para o tratamento de doença vascular periférica quando a revascularização cirúrgica não é possível (SARKAR; SEMENZA, 2011).

3.3. Prostaglandina e terapia angiogênica

A terapia angiogênica é uma técnica promissora que, baseada em estudos experimentais, demonstra que fatores de crescimento ou genes são capazes de aumentar a densidade capilar, podendo, desse modo, ser essa técnica utilizada para reduzir o impacto da isquemia muscular e aumentar o fluxo sanguíneo para o tecido isquêmico, bem como auxiliar na formação de uma circulação colateral. Muitas substâncias tem a habilidade de intensificar o processo de angiogênese para compensar a isquemia do tecido (GONÇALVES, 2006).

A Prostaglandina E1 (PGE1) pode ser citada como uma dessas substâncias utilizada para terapia angiogênica, conhecida por promover vasodilatação e inibir a agregação plaquetária, uma droga tolerada, de fácil administração e relativamente pouco dispendiosa, que age sobre as células endoteliais humanas promovendo o processo angiogênico: a proliferação, migração e formação de estruturas semelhantes a capilares (GONÇALVES, 2006).

Os estudos sobre a angiogênese (ou neovascularização) surgiram a partir de 1935 com a utilização da placenta humana (CALUX et al., 1998). Este termo designa as etapas pelas quais novos vasos sanguíneos vão se desenvolver a partir de uma estrutura endotelial pré-existente, como é o caso da formação de vasos no adulto, em resposta às demandas teciduais (DONNELLY; YEUNG, 2002; COUFFINHAL et al., 2001; KENPINAS, 2002; FOLKMAN, 1971).

Trata-se de um processo complexo, com várias fases, que inclui a ativação das células endoteliais e pericitos, com aumento do volume do nucléolo e hipertrofia das células endoteliais; degradação da membrana basal do vaso-mãe; migração e proliferação das células endoteliais; formação do lúmen vascular; migração e proliferação dos pericitos a partir dos vasos pré-existentes e sua deposição em torno de novos capilares; alteração da matriz extracelular e formação de nova membrana basal; formação das alças capilares; persistência e diferenciação dos capilares neoformados; formação da rede capilar e organização dos vasos maiores (BECKER, 1994; CLOVER; MCCARTHY, 2003; CALUX, 1998; FOLKMAN, 1971; YANCOPOULOS et al., 2000; SPECK, 1999).

Esta fase inicial é mediada por vários fatores de crescimento, incluindo o Fator de Crescimento do Fibroblasto (FGF), o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e o Fator de Crescimento da Insulina (IGF-1), todos com afinidade pela heparina, sendo mitogênicos e estimulando as células endoteliais a migrarem e formarem novos vasos (CALUX, 1998). Entre outros fatores de crescimento estão, as citocinas, as proteases e os inibidores da protease provenientes de monócitos ativados, de células endoteliais, de células musculares lisas e de plaquetas (BECKER, 1994; CLOVER; MCCARTHY, 2003; FOLKMAN, 1971; YANCOPOULOS et al., 2000; ABO-AUDA; BENZA, 2003).

Após esta fase, ocorre um estágio subsequente de estabilização dos vasos neoformados, com a participação de outros fatores angiogênicos, como a angiopoitina-1, a angiopoitina-2 e o fator de crescimento derivado de plaqueta (BECKER, 1994; CLOVER; MCCARTHY, 2003), além da proteína-1 quimiotática do monócito (MCP1) (LINDNER; MACING, 2001).

Várias substâncias têm sido usadas na indução e ou manutenção da angiogênese, tais como: o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), o Fator de Crescimento do Fibroblasto (FGF), o Fator de Crescimento da Insulina (IGF-1), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fator de Crescimento da Célula Endotelial derivado de Plaquetas (PD-ECGF), fator de crescimento placentário, fator de crescimento do hepatócito, fator de crescimento da epiderme, diversas moléculas de baixo peso molecular, como angiopoitina, butinil-glicerol, prostaglandinas E1 e E2, nicotinamida, adenosina, leptina, proliferina, tirosina, interleucina 8, produtos do ácido hialurônico, ácido hidroxucosatrínico e ácido ohádico, e complexos de cobre (ISNER; ASAHARA, 1999; SPECK, 1999; ABO-AUDA; BENZA, 2003; HENRY, 1999; EMANUELI; MADEDDU, 2001). A limitação do uso de tais drogas está relacionada com a resposta ao estímulo angiogênico artificial, pois há uma tendência natural para regressão do processo, a menos que ocorra uma remodelação para maturação e se tornem estáveis (CLOVER; MCCARTHY, 2003; DARLAND; D'AMORE, 1999).

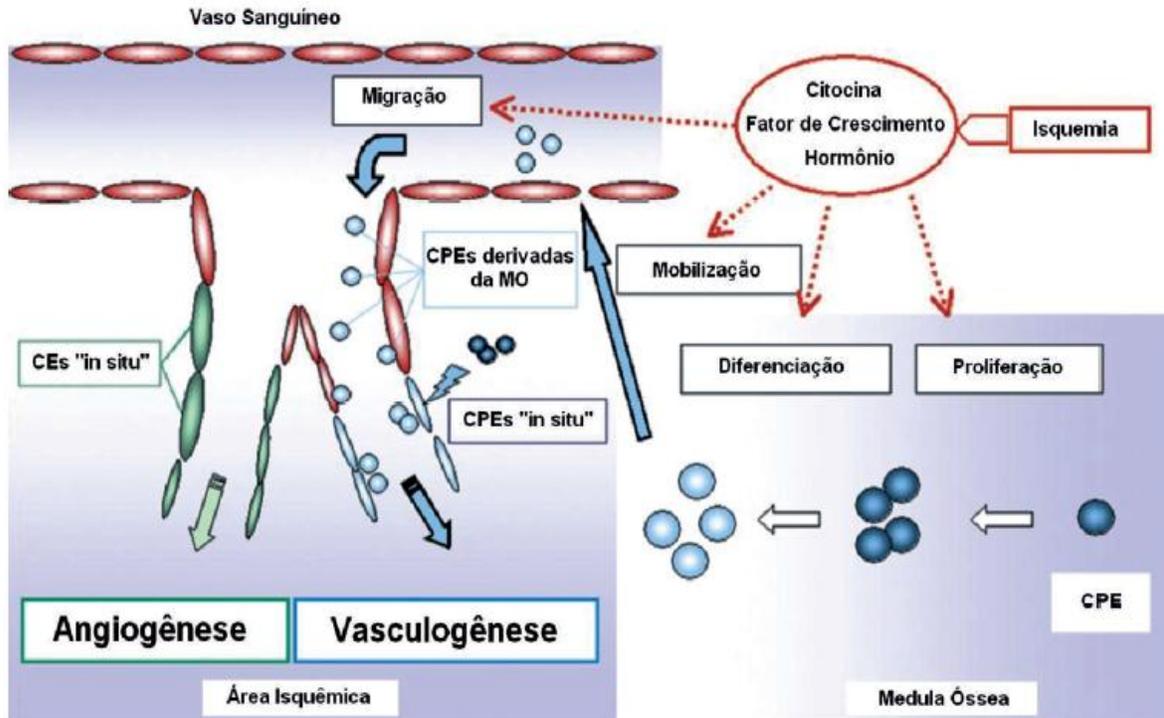


Figura 02. Figura ilustrativa do processo de angiogênese e vasculogênese mediado por isquemia e fatores angiogênicos.

4 MÉTODOS

4.1. Amostra

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Paraná sob o parecer nº 137/2010.

Foram utilizados 57 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar-UEM, machos, procedentes do Biotério Central da UEM. A experimentação foi desenvolvida nos laboratórios de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e laboratório de Histologia Animal, do Departamento de Ciências Morfológicas da UEM.

Os animais com 60 dias de vida, provenientes do Biotério central da UEM foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia, sob temperatura de 23°C com ciclo de iluminação claro/escuro de 12hs. Os animais foram acondicionados em número de 4 ratos/caixa, durante um período de 4 meses no qual um grupo foi alimentado com dieta normal (ração Nuvital-Nuvilab®) (grupo controle) e outro foi alimentado com dieta hipercalórica, também denominada cafeteria, para indução de obesidade (grupo obeso).

4.2. Tipos de dieta dos animais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grandes grupos, um no qual foi induzido a obesidade e outro grupo controle (não induzido à obesidade). No grupo obesidade a dieta hipercalórica (cafeteria) foi iniciada aos 60 dias de idade dos animais. Esta dieta hipercalórica era constituída por alimentos como: *chips* sabor queijo ou *bacon*, geleia de mocotó, paçoca de amendoim, salsichas, mortadela, refrigerantes do tipo cola ou guaraná, pão francês, bolachas do tipo recheada e do tipo *wafer*, ração e água *ad libitum*, e esses alimentos foram divididos nos dias da semana, de acordo com a tabela 1 e foi mantida durante todo o período experimental.

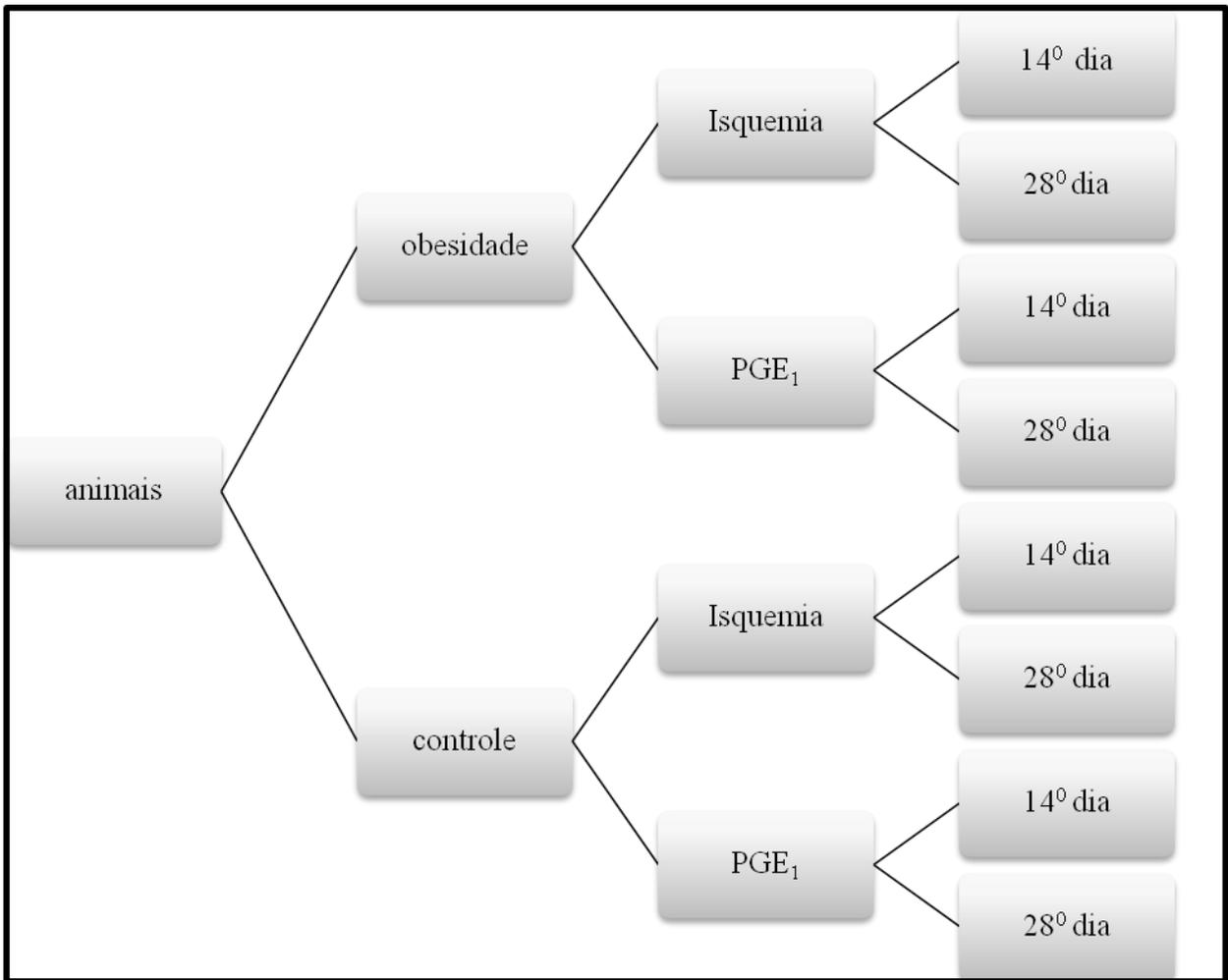
Os animais controle vinham do biotério central recebendo dieta padrão com ração (Nuvital ®) e água *ad libitum* e esta dieta foi mantida durante todo o período experimental.

Tabela 01. Distribuição semanal dos alimentos oferecidos aos animais participantes do grupo induzido a obesidade por dieta hipercalórica (cafeteria).

Dias da Semana	Alimentos
Segunda-feira	Mortadela, <i>chips</i> sabor <i>bacon</i> , bolacha <i>waffer</i> , geleia de mocotó, ração, refrigerante e água.
Terça-feira	Salsicha, <i>chips</i> sabor queijo, bolacha recheada, ração, refrigerante e água.
Quarta-feira	Pão branco, paçoca de amendoim, ração, refrigerante e água.
Quinta-feira	Mortadela, <i>chips</i> sabor <i>bacon</i> , bolacha <i>waffer</i> , ração, refrigerante e água.
Sexta-feira	Salsicha, <i>chips</i> sabor queijo, bolacha recheada, ração, refrigerante e água.

4.3. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grandes grupos denominados como grupo obesidade (induzido à obesidade por dieta hipercalórica) e grupo controle (não induzido à obesidade e alimentado com dieta padrão), redistribuídos dentro dos dois grandes grupos em dois subgrupos de acordo com a forma de procedimento de tratamento que foram submetidos isquemia cirúrgica (Isquemia) e isquemia cirúrgica e aplicação intramuscular de prostaglandina (PGE1), e dentro dos subgrupos que foram distribuídos de acordo com o tratamento aplicado, novamente foram redistribuídos em dois subgrupos de acordo com o período que foi sacrificado após o tratamento aplicado (14^o dia e 28^o dia), como segue na figura 01 abaixo.



QUADRO 01. Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o tipo de dieta alimentar, tipo de tratamento submetido e período que o animal foi morto após o tratamento aplicado.

4.4 Procedimentos de indução da isquemia

Aos 180 dias de idade os animais foram anestesiados por via intramuscular, com cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun[®]) e cloridrato de quetamina (Ketalar[®]) na relação 1:1, empregando-se desta associação 1 ml. Kg⁻¹ peso corporal. Aguardou-se até que os reflexos interdigital e ocular desaparecessem. A ventilação pulmonar foi mantida de maneira espontânea. Quando houve sinais de superficialização da anestesia foi aplicado mais 0,1 ml da mesma solução anestésica.

Após a tosquia da região medial do membro caudal direito, os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal sobre a mesa operatória, com imobilização

dos membros torácicos e caudais, com elásticos. A antisepsia foi realizada com tintura de polivinilpirolidona-iodo a 1% e a delimitação do campo operatório.

Foi feita uma incisão longitudinal com bisturi lâmina 15 interessando pele e tela subcutânea, estendendo-se distalmente do ligamento inguinal até um ponto próximo à patela. Após a identificação do feixe vâsculo-nervoso, a artéria femoral foi dissecada em toda sua extensão, desde a região inguinal até a artéria poplítea, usando-se lupa cirúrgica com aumento de 3x. A artéria ilíaca externa foi dissecada e ligada com fio de algodão 4-0. A artéria femoral foi completamente excisada, desde sua origem proximal, na artéria ilíaca externa, até a sua porção distal, onde ocorre a bifurcação em artérias safena e poplítea. Deste modo provocou-se a isquemia no membro caudal dos ratos. Os planos anatômicos foram aproximados e a pele suturada com fio de poliamida 5-0.

Até a recuperação da anestesia os animais foram observados quanto ao reflexo ocular (pela estimulação da pálpebra superior com gaze), frequência respiratória (observação direta dos movimentos tóraco-abdominais) e frequência cardíaca (verificada com estetoscópio pediátrico fixado na região anterior do tórax).

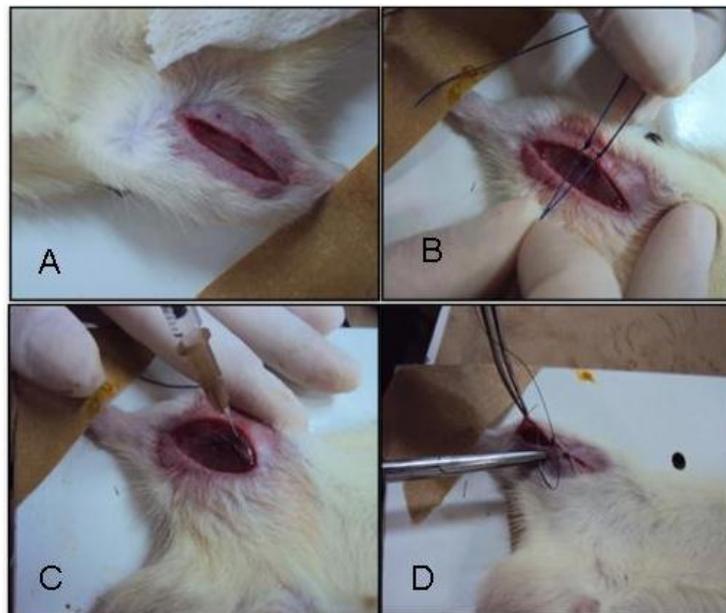


Figura 03. Fotografias da região medial do membro caudal de rato, após incisão da pele e tela subcutânea (A), mostrando a disposição do feixe vâsculo-nervoso com destaque para artéria femoral isolada e dissecada em toda sua extensão (B), aplicação de injeção intramuscular de PGE1 (C) e fechamento da incisão cirúrgica (D).

4.4.1. Aplicação da Prostaglandina E 1(PGE1) após isquemia

Imediatamente após o procedimento de isquemia e antes da sutura da pele, a PGE1, na dose de $5 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, foi cuidadosamente injetado nos animais obesos e controle do subgrupo tratado com prostaglandina, utilizando-se seringas de 1 ml e agulhas 30 G^{1/2}, via intramuscular, em pontos equidistantes, diretamente nos músculos grácil e vasto medial do membro caudal.

Cada ampola continha 20 μg de Alprostadiil[®] (PGE1), sendo apresentada sob a forma liofilizada. A diluição foi feita em 5 ml de água destilada, obtendo-se assim uma concentração de $4 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

4.5. Dados de Observação

Os animais foram observados por um período de 14 e 28 dias após a administração da prostaglandina E1, durante o período de observação os animais foram examinados diariamente quanto a presença de hematoma, deiscência infecção ou isquemia da borda da ferida, a ocorrência de necrose da pele, dedos ou gangrena e observados quando à presença de claudicação ou paralisia.

4.6. Eutanásia e coleta dos tecidos

Os animais foram pesados e em seguida anestesiados com cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun[®]) e cloridrato de quetamina (Ketalar[®]) na relação 1:1, empregando-se desta associação 1 ml.Kg^{-1} peso corporal. Após foi feita incisão na região medial do membro caudal, isolada a área onde a artéria femoral foi dissecada, e um segmento englobando tecido muscular e o feixe vaso-nervoso foi retirado (Figura 04).

Para a análise das variáveis antropométricas, foi realizada a laparotomia para a retirada dos tecidos adiposos periepididimal, retroperitoneal, subcutâneo e mesentérico e pesagem dos mesmos em balança analítica. Para cada animal, foi realizada coleta de uma amostra de sangue para avaliação plasmática de glicose, colesterol e triglicerídeos. Após a coleta dos tecidos e ainda sob efeito anestésico os animais foram submetidos à superdosagem de anestésico induzindo a parada cardiorrespiratória.



Figura 04. Fotografia mostrando a peça retirada para o procedimento histológico do membro caudal isquêmico, contendo tecido muscular e o feixe vásculo-nervoso sem a artéria femoral.

As amostras contendo tecido muscular e o feixe vásculo-nervoso foram fixadas em paraformaldeído 10% tamponado. Após um período de fixação de 24 horas, as amostras foram processadas para inclusão em parafina. Cortes histológicos semi-seriados de 5 μm . As lamínas foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), para avaliação histomorfométrica das fibras e contagem de vasos e para procedimento imunohistoquímico para a detecção da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF- *vascular endothelial growth factor*).

4.7. Estudo Histomorfométrico

Para a análise da área de secção transversa foram capturadas imagens com câmara Q Capture Olympus adaptada a microscópio Olympus BX41 (Tóquio, Japão) com objetiva de 40X. A área de aproximadamente 100 fibras/animal foi determinada com auxílio de um software Image Pro-Plus e os resultados foram expressos em μm^2 .

4.8. Determinação do número de capilares sanguíneos

Para contagem dos capilares, foi utilizado um retículo de 10x10 pontos, acoplado à ocular em microscópio óptico Olympus®BX41 (Tóquio, Japão) com a objetiva de 40x. O número de capilares foi determinado nos cortes histológicos, totalizando 60 campos microscópicos/animal, sendo que cada campo mediu 0,24 mm². As contagens foram realizadas por dois observadores e os resultados foram expressos como a média das duas contagens.

4.9. Reação imunohistoquímica

Cortes histológicos foram submetidos à reação imunohistoquímica para detecção do Receptor-3 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) presente nas células endoteliais. Após desparafinização e reidratação foi feita o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 2% em metanol por 10 minutos. Após o bloqueio dos sítios inespecíficos em BSA, as laminas foram incubadas *overnight* a 4°C com anticorpo primário anti-VEGF (Invitrogen, New York, EUA) produzido em coelhos. Para a revelação das laminas foi utilizado kit *Histostain®-Plus Peroxidase Invitrogen® 2nd Generation LAB-SA Detection System*. Os cortes foram lavados com água destilada, desidratados em álcool 96% e xilol e montados com resina Permound. A marcação qualitativa dos capilares sanguíneos foi analisada em microscópio óptico (Olympus® BX41) para a determinação da positividade da reação.

4.10. Avaliação das dosagens plasmáticas

As amostras de sangue retiradas foram utilizadas para a determinação das concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos através de kits de métodos enzimáticos colorimétricos Gold Analisa Diagnósticos® (Belo Horizonte, Brasil) em espectrofotômetro BIOPLUS UV 2000® (São Paulo, Brasil).

4.11. Análise Estatística

Foi feito uso da média e desvio padrão para a análise descritiva dos dados. A análise inferencial foi feita a partir da *Analysis of Variance* (ANOVA) mista de medidas repetidas para análise da área das fibras e número de capilares com interação entre grupos de procedimentos (isquemia, salina e PGE1), momentos de sacrifício (14^o dia e 28^o dia) e estado nutricional (obesidade e controle). A homogeneidade de variância dos dados foi confirmada a partir do teste de *Levene*, para a comparação entre os ratos sacrificados no 14^o dia e 28^o dia, para a comparação entre os animais do grupo obesidade e controle. Já para as variáveis antropométricas e plasmáticas, foi utilizado o teste *t* de *Student* para amostras dependentes. O nível de significância foi pré-estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

Como um dos interesses do estudo foi analisar a interferência da obesidade sobre a ação e o tempo de ação da prostaglandina E₁ e seu poder angiogênico no membro caudal isquêmico, os resultados obtidos foram divididos e comparados entre a condição controle e obesidade.

Na avaliação macroscópica não houve problemas de inflamação ou infecção nas feridas operatórias, deiscência de sutura, sinais de isquemia, como cianose, hipotermia, queda de pêlos, necrose ou claudicação do membro caudal isquêmico.

Tabela 02. Comparação das variáveis antropométricas, adiposidade e variáveis plasmáticas de ratos com obesidade induzidos por dieta de cafeteria e ratos controle, alimentados com dieta padrão que tiveram o membro caudal direito isquêmico e receberam prostaglandina E1 intramuscular ou foram submetidos à isquemia e não receberam tratamento. Os animais foram mortos aos 14 ou 28 dias após o procedimento de isquemia.

	Controle 14 dias	Controle 28 dias	Obeso 14 dias	Obeso 28 dias
MEDIDA ANTROPOMÉTRICA				
Peso Corporal (g)	409,4± 7,6	414,8 ± 10,2	473,8 ± 66,3*	480,6 ± 66,7*
ADIPOSIDADE				
Gordura retroperitoneal (g)	6,4 ± 0,8	7,3 ± 1,9	13,8 ± 4,5*	14,3 ± 6,8*
Gordura periepididinal (g)	5,2 ± 0,5	6,2 ± 1,5	11,2 ± 4,6*	10,5 ± 5,1*
Gordura subcutânea (g)	1,9 ± 0,1	2,6 ± 0,8	3,2 ± 1,0	4,2 ± 1,9*
Gordura mesentérica (g)	3,3 ± 0,3	4,5 ± 1,2	9,3 ± 3,9*	9,2 ± 3,8*
Somatório gorduras (g)	16,8 ± 1,6	20,7 ± 4,7	38,1 ± 12,9*	39,0 ± 16,8*
MEDIDAS PLASMÁTICAS				
Glicemia (mg/dL)	137,1 ± 5,7	135, 2 ± 3,0	151,1 ± 21,2	145,8 ± 25,7
Colesterol total (mg/dL)	81,9 ± 3,3	89,1 ± 3,9	89,9 ± 6,9	85,2± 9,1
Triglicerídeos (mg/dL)	65,1 ± 2,8	62,4 ± 9,8	84,8 ± 28,7*	87,4 ± 30,7*

Nota: * p <0,05 significância em relação ao grupo controle de mesma idade.

Na tabela 02 estão apresentados os dados referentes aos valores expressos em gramas (g), de peso corporal, dos diferentes territórios de distribuição do tecido adiposo e o somatório das gorduras (retroperitoneal, periepididinal, subcutânea e mesentérica) e das medidas plasmáticas expressas em micrograma/decilitro (mg/dl), glicemia, colesterol total e triglicerídeos, dos animais do grupo obesidade e controle, sacrificados aos 14 dias e aos 28 dias de observação, isquêmicos e isquêmicos com aplicação de prostaglandina E1.

Os animais dos grupos obesidade 14 dias e 28 dias, que tiveram acesso a dieta de cafeteria ao longo de todo o período experimental apresentaram valores significativamente maiores de peso corporal, adiposidade e somatório das gorduras quando comparados com seus controles de 14 e 28 dias, que foram alimentados ao longo de todo experimento com dieta padrão (ração). Em relação às variáveis plasmáticas, os níveis de triglicérides foram significativamente maiores nos grupos obesidade 14 e 28 dias quando comparados com seus controles, e não houve diferença significativa das variáveis glicemia e colesterol total entre os grupos obesidade e controle.

A figura 05 apresenta o número de capilares encontrados nos cortes histológicos corados com HE dos animais do grupo obesidade e controle, sacrificados aos 14 dias e aos 28 dias de observação, isquêmicos e isquêmicos com aplicação de prostaglandina E1. Não foram observadas diferenças significativas para os animais controle.

Os animais do grupo obeso, isquemia com injeção + PGE1, 14 dias, apresentaram significativamente um maior número de capilares ($9,3 \pm 0,3$) quando comparado com o grupo obeso, isquemia, 14 dias ($5,5 \pm 0,5$) e o grupo controle, isquemia + PGE1, 14 dias ($5,7 \pm 0,8$).

Os animais do grupo obeso, isquemia + PGE1, 28 dias, apresentaram significativamente um maior número de capilares ($10,2 \pm 0,5$) quando comparados com grupo obeso, isquemia, 28 dias ($7,2 \pm 0,3$); grupo obeso, isquemia, 14 dias ($5,5 \pm 0,5$), grupo obeso, isquemia + PGE1, 14 dias ($9,3 \pm 0,3$) e controle, isquemia + PGE1, 28 dias.

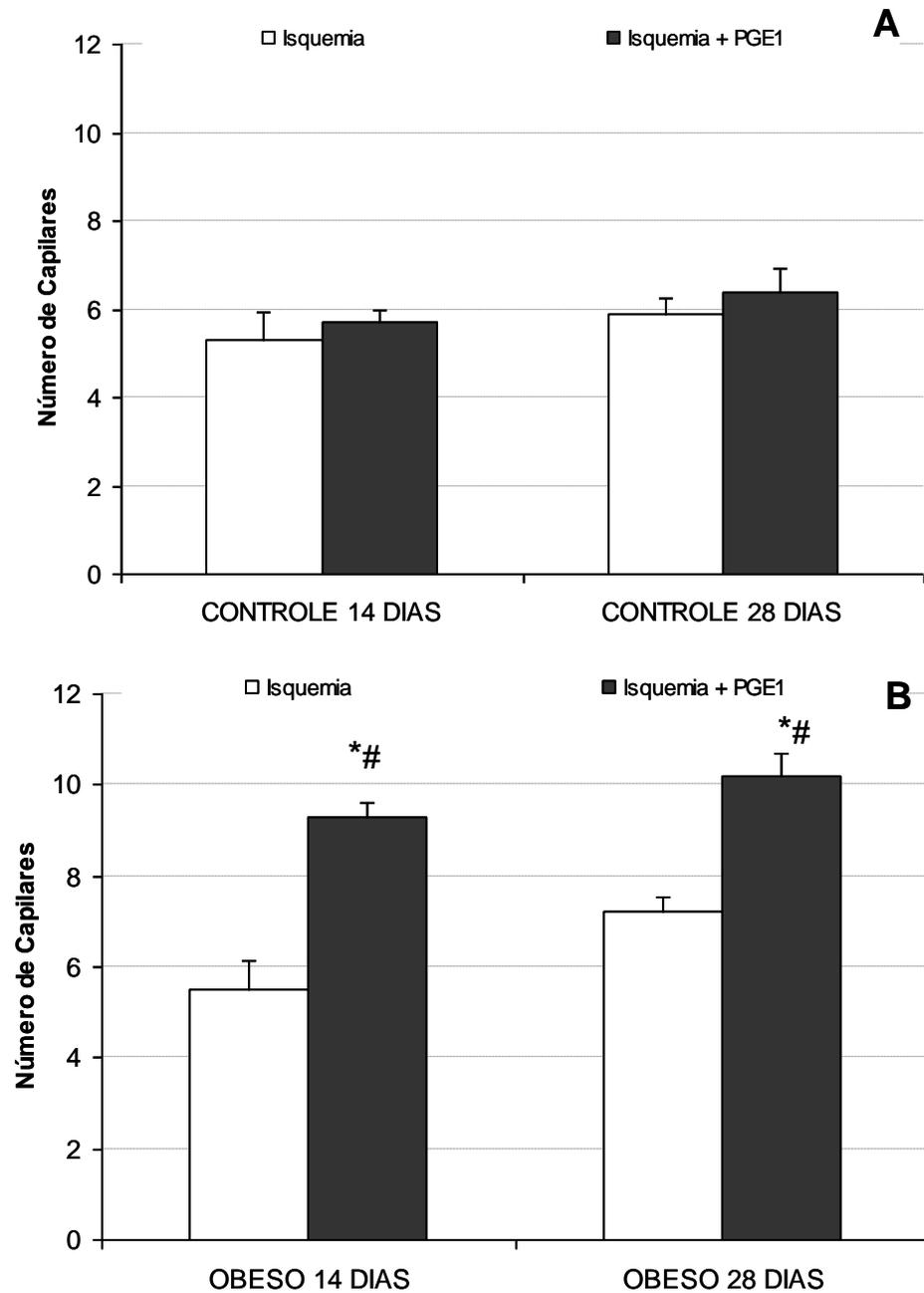


Figura 05. Número de capilares quantificados por cortes histológicos corados com técnica de Hematoxilina Eosina (HE) para animais controles (**A**) e obesos (**B**) avaliados aos 14 e 28 dias após procedimento de isquemia ou isquemia com injeção de prostaglandina E1. Valores mostram médias \pm EPM de 4 a 6 animais por grupo, * $P < 0,05$ em relação ao grupo obeso isquemia, # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle isquemia + PGE1.

A figura 06 mostra fotomicrografias de capilares sanguíneos ao redor da fibra muscular esquelética, capturadas em microscopia de luz de cortes histológicos corados com HE e no aumento de 40x, de ratos do grupo obesidade, isquêmicos com aplicação de PGE1, sacrificados com 14 e 28 dias de observação e com aumento de 10x, imagem de rato do grupo controle, isquêmico com aplicação de PGE1, sacrificado com 28 dias de observação. Inferindo uma maior quantidade de capilares no grupo obesidade, isquêmicos com aplicação de PGE1, com 28 dias de observação.

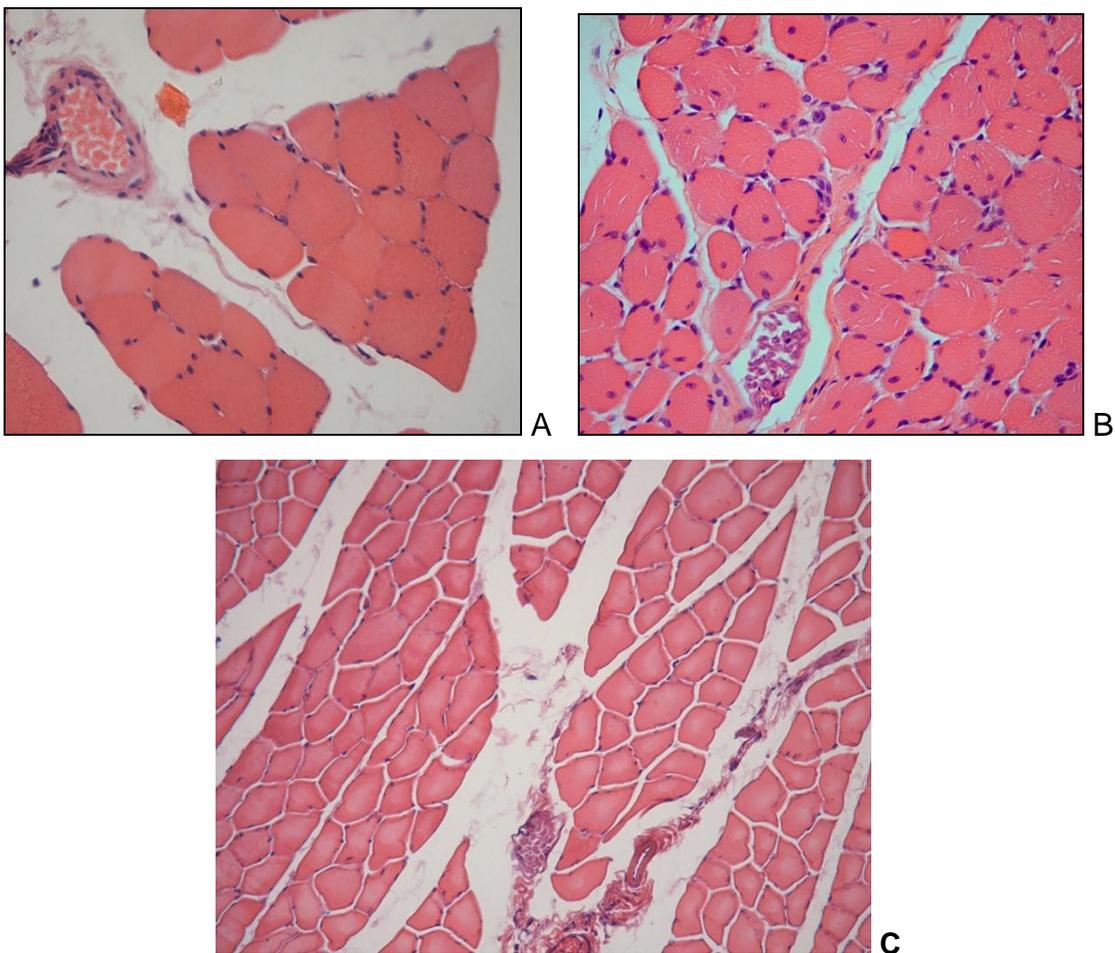


Figura 06. Fotomicrografias do músculo esquelético isquêmico do membro caudal direito de ratos. Observado a distribuição de capilares sanguíneos ao redor das fibras musculares em animal obeso tratado com PGE1 observado por (A) 14 dias após tratamento (B) 28 dias após tratamento e (C) em animais controle tratados com PGE1 observados por 28 dias.

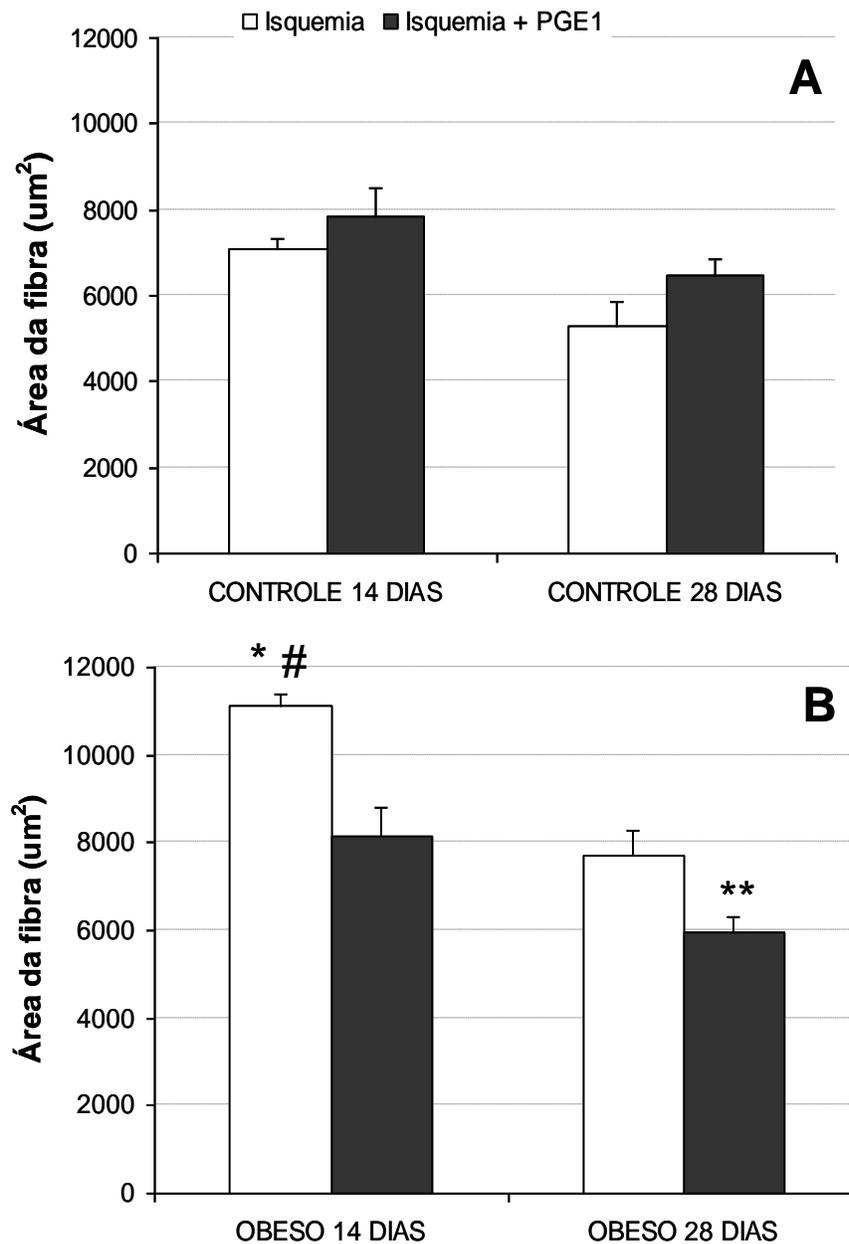


Figura 07. Área da fibra muscular de membro caudal isquêmico de animais controles (A) e obesos (B) avaliados aos 14 e 28 dias por técnica de Hematoxilina Eosina (HE) após procedimento de isquemia ou isquemia com injeção de prostaglandina E1. Valores mostram médias \pm EPM de 4 a 6 animais por grupo, * $P < 0,05$ em relação aos demais grupos obesos, # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle isquemia, ** $P < 0,05$ em relação ao grupo I + PGE1 14 dias.

A figura 07 apresenta a área da fibra muscular encontrados nos cortes histológicos corados com HE dos animais do grupo obesidade e controle, sacrificados aos 14 dias e aos 28 dias de observação, isquêmicos e isquêmicos com aplicação de prostaglandina E1. Também para os animais controles não foram observados diferenças relacionadas a aplicação da PGE1, nem do tempo de aplicação.

Os animais do grupo obeso, isquemia, 14 dias apresentaram significativamente uma maior área de fibra muscular ($11137 \pm 613 \text{ um}^2$) quando comparado com grupo obeso, isquemia + PGE1, 14 dias ($8131 \pm 234 \text{ um}^2$); grupo obeso, isquemia, 28 dias ($7701 \pm 570 \text{ um}^2$), grupo obeso, isquemia + PGE1, 28 dias, grupo controle, isquemia, 28 dias ($5287 \pm 244 \text{ um}^2$) e grupo controle, isquemia, 14 dias.

Os animais do grupo obeso, isquemia + PGE1, 14 dias, apresentaram significativamente uma maior área de fibra muscular quando comparados com o grupo obeso, isquemia + PGE1, 28 dias,

A figura 08 mostra a razão capilar/fibra muscular, encontrada nos cortes histológicos corados em HE dos animais do grupo obesidade e controle, sacrificados aos 14 e 28 dias de observação, isquêmicos e isquêmicos com aplicação de prostaglandina E1.

Os animais do grupo obeso, isquemia + PGE1, 28 dias ($1,71 \pm 0,10$), apresentaram valores significativamente maiores em relação aos grupos: grupo obeso, isquemia, 28 dias ($0,93 \pm 0,06$); grupo obeso, isquemia, 14 dias ($0,49 \pm 0,10$); grupo obeso, isquemia + PGE1, 14 dias ($1,14 \pm 0,06$) e grupo controle, isquemia + PGE1, 28 dias ($0,99 \pm 0,10$).

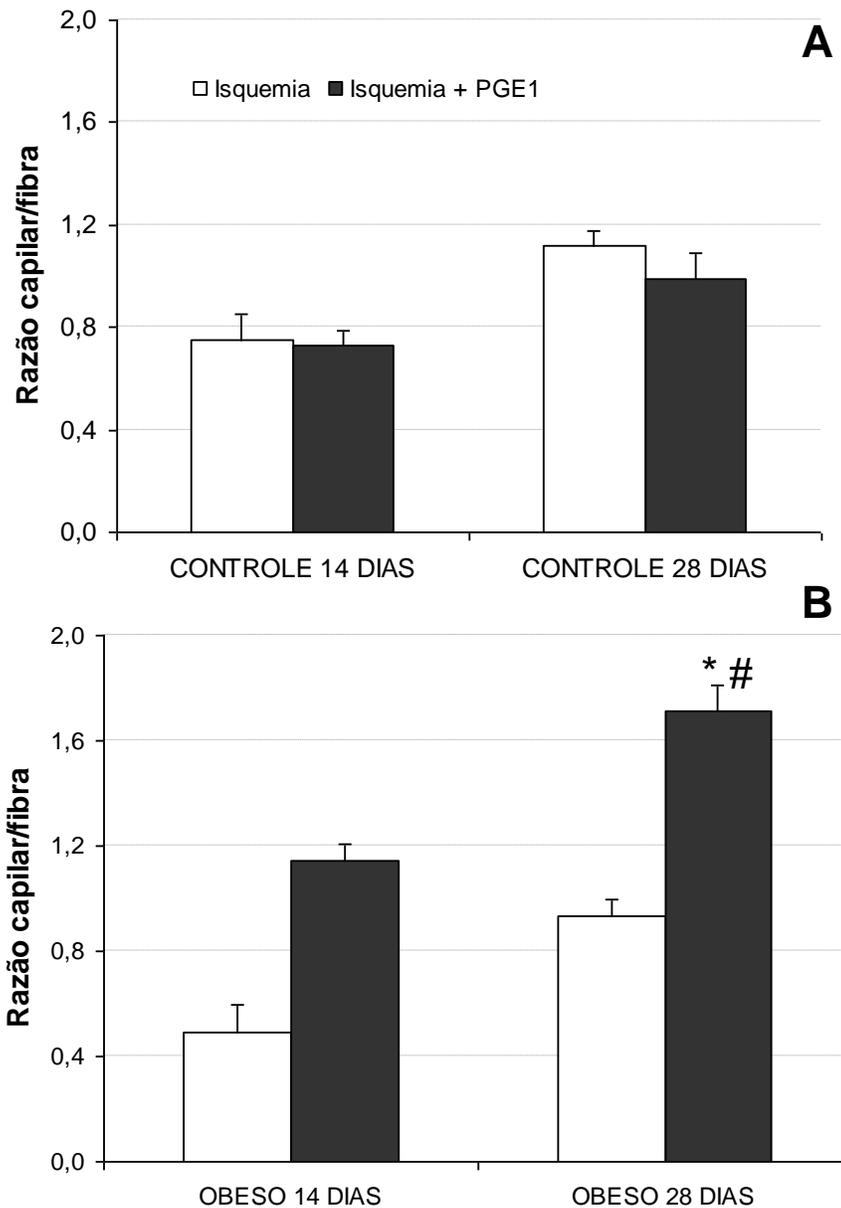


Figura 08. Razão capilar/ fibra muscular de membro caudal isquêmico de animais controle (A) e obesos (B) avaliados aos 14 e 28 dias pós técnica de hematoxilina e eosina (HE) após procedimento de isquemia ou isquemia com injeção de prostaglandina E1. Valores mostram médias \pm EPM de 4 a 6 animais por grupo, * $P < 0,05$ em relação aos grupos obesos e # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle I + PGE1 28 dias.

Pela técnica de imunohistoquímica com os anticorpos primários, anti-VEGF para detecção do receptor-3 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), foi possível identificar marcações determinando a positividade da reação. Na figura 09 podemos observar capilares marcados dos animais obesos em comparação aos animais controle.

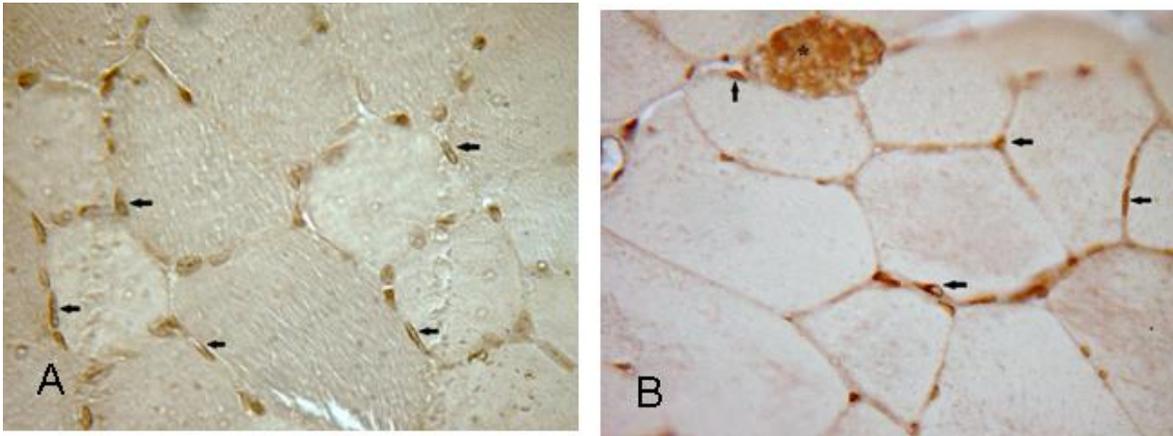


Figura 09. Fotomicrografia do músculo isquêmico de rato (A) obesos e (B) magro. As setas indicam capilares imunocorados com VEGF entre as fibras musculares. (*) representa uma vênula com hemáceas. Aumento original: 100x.

6 DISCUSSÃO

A obesidade é considerada uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, prevalente na população mundial e em todas as faixas etárias. O grande número de casos de obesidade parece ser resultado de mudanças nos hábitos alimentares, como dietas hipercalóricas e lipídicas e de hábitos de vida como a redução da prática de atividade física. O acúmulo excessivo de tecido adiposo está associado com o surgimento de uma série de doenças, também altera o perfil lipídico com aumento dos triglicerídeos, lipoproteínas de baixa densidade e redução das lipoproteínas de alta densidade, afeta o perfil glicêmico desses indivíduos predispondo ao desenvolvimento do *diabetes mellitus* tipo 2, além de estar relacionada com o excesso de mortalidade decorrente de doenças cardiovasculares (GOULARTE, 2011).

O uso de modelos animais na pesquisa científica usualmente objetiva reproduzirem experimentalmente e de forma controlada uma série de doenças que acometem os seres humanos, frente a grande prevalência de obesidade no mundo os modelos animais que reproduzem as características de humanos obesos são de extrema importância para elucidar uma série de fatores envolvidos com a obesidade e suas consequências.

No presente estudo foi introduzido para alguns grupos de animais (grupo obesidade), um modelo experimental de dieta muito vantajoso, por provocar uma obesidade semelhante à humana, que é induzida por uma dieta altamente palatável constituída por alimentos hipercalóricos e lipídicos que fazem parte dos hábitos alimentares das pessoas de países ocidentais, conhecido como dieta de cafeteria.

Nesse grupo de animais quando comparados com os controles, não foi observado alterações nos níveis de colesterol total ou glicemia, independente das variáveis: momento do sacrifício (aos 14 ou 28 dias pós- procedimento de tratamento) ou tratamento aplicado (isquemia ou isquemia com injeção intramuscular de prostaglandina). Entretanto, houve aumento dos triglicerídeos, peso corporal e somatório das gorduras significativamente em relação aos grupos controle, inferindo

que o tipo de dieta hipercalórica e lipídica (cafeteria) aplicado aos animais foi eficaz para promover modelos de obesidade e mimetizar riscos cardiovasculares.

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que a obesidade aumenta significativamente o risco de morbidade e mortalidade por causas cardiovasculares, sendo muitas vezes considerado um fator de risco cardiovascular, independente de alterações na pressão arterial, resistência a insulina, ou níveis de colesterol (REHMAN et al., 2003).

Com o envelhecimento da população e um aumento na prevalência de doenças ateroscleróticas tais como diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade e hipertensão, há um número crescente de pacientes com isquemia de membros. O número de pacientes com artérias severamente doentes que não podem ser eficazmente tratados com as técnicas de revascularização atuais aumentou, e por causa da isquemia grave perdem o membro, assim afetando negativamente a qualidade de vida (ESAKI et al., 2009).

Apesar dos avanços da medicina, persiste alta a incidência da oclusão arterial dos membros, decorrente do aumento dos fatores de risco e da aterosclerose. É uma doença grave que apresenta, inclusive, frequência elevada de amputações dos membros e de óbito. A isquemia gerada pela obstrução arterial leva à falência energética da célula muscular, à reação inflamatória e a alterações bioquímicas (SILVEIRA; YOSHIDA, 2004).

A vasculatura do músculo esquelético pode remodelar-se para melhorar a oferta de oxigênio para o músculo ativo. A remodelação ocorre quando a vasculatura existente torna-se insuficiente para atender às demandas metabólicas dos tecidos, secundário a qualquer aumento da atividade muscular ou obstrução vascular (insuficiência arterial periférica). Dois tipos distintos de remodelação vascular podem ocorrer no músculo esquelético frente à isquemia, a arteriogênese e a angiogênese. Arteriogênese e angiogênese diferem em vários níveis, a arteriogênese envolve o alargamento das artérias existentes e envolve tanto a proliferação de células endoteliais e do músculo liso. A angiogênese envolve o crescimento de novos capilares dentro do músculo a partir de um vaso pré-existente (LLOYD et al., 2005).

A angiogênese consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos num tecido vivo. Este processo depende da proliferação de células endoteliais vasculares e

normalmente ocorre em resposta a certos estímulos. As teorias fisiopatológicas atuais salientam o fato de a angiogênese depende de um equilíbrio delicado entre fatores estimuladores e fatores inibidores da angiogênese. De acordo com este princípio, a angiogênese pode ser o resultado de um excesso de atividade dos fatores estimuladores ou de uma redução da atividade dos fatores inibidores da angiogênese (WHITE et al., 1998).

Os reguladores positivos da angiogênese conhecidos como fatores angiogênicos, podem ser divididos em dois grandes subgrupos: os fatores de crescimento e as citocinas. Entre os fatores de crescimento podemos citar, o fator de crescimento do fibroblasto, o fator de crescimento derivado das plaquetas, o fator de crescimento vascular endotelial, fatores de crescimento semelhantes à insulina e fatores estimulantes da multiplicação de granulócitos e monócitos, entre outros. Já entre as citocinas, as mais citadas na literatura são as interleucina 6 e 8 (LLOYD et al., 2005).

A revascularização tecidual é estimulada pelo próprio tecido sob hipóxia, desencadeando a proliferação e reorganização das células endoteliais vasculares, os músculos esqueléticos e o miocárdio aumentam a densidade capilar e/ou a relação de capilares por fibra muscular, para manter ou melhorar o balanço funcional entre demanda e liberação de oxigênio (SILVA et al., 2009).

Após a isquemia, o processo de angiogênese se inicia em um período de 1 a 3 dias, atingindo o pico da proliferação por volta de 7 dias e havendo, a partir de então, uma regressão rápida e progressiva no número de vasos neoformados até 28 dias. Dessa forma para a manutenção do efeito angiogênico iniciado pela isquemia seria necessário à utilização de fatores angiogênicos artificiais que estimulem a manutenção da angiogênese (terapia angiogênica) (MORESCHI et al., 2007).

A demonstração de que alguns fatores de crescimento vascular têm o potencial de induzir angiogênese no tecido isquêmico tem estimulado a investigação de novas técnicas de tratamento para pacientes com doença arterial. Isso se deve à possibilidade de induzir angiogênese e estabelecer circulação colateral, especialmente nos casos onde a terapêutica convencional e as técnicas de revascularização tradicionais, percutânea e cirúrgica são inviáveis. A complexa cascata de eventos que ocorre

durante a neovascularização em resposta à isquemia envolve diversos fatores de crescimento, estimuladores e receptores (KALIL et al., 2010).

Ensaio clínico trazem resultados controversos, muitos demonstrando melhora clínica e evidência de angiogênese e outros não apresentando diferenças na perfusão quando comparados aos seus controles. Dessa forma, apesar de promissores, permanecem não totalmente esclarecidos os efeitos clínicos da terapia angiogênicas sobre a vascularização em suas diversas formas e vias de administração, justificando-se novos estudos (KALIL et al., 2010).

Os modelos em animais de experimentação tentam reproduzir as condições de isquemia encontradas em seres humanos e com isso proporcionar um melhor entendimento da fisiopatologia da doença e das suas alternativas de tratamento.

Partindo deste embasamento teórico, surgiu a ideia de promover cirurgicamente a redução do fluxo sanguíneo (isquemia) no membro caudal de ratos obesos e controle e avaliar a neoformação vascular em músculo esquelético. Administrar após isquemia injeção intramuscular de PGE1 em um grupo de animais (isquemia + PGE1) mantendo o outro apenas com isquemia, para avaliar o seu poder angiogênico em diferentes fases da formação de circulação colateral nos tempos (14 dias e 28 dias após tratamento). E através de avaliação histológica convencional pela coloração com HE observamos que nos animais que se utilizou a PGE1, do grupo obesidade, houve uma maior presença de vasos no tecido muscular esquelético isquêmico, quando comparados com os animais que apenas se foi utilizado isquemia, associados há mais longos tempos de observação, mais precisamente aos 28 dias de observação.

A prostaglandina E1 (PGE1) é um vasodilatador que aumenta a perfusão periférica de sangue e melhora a função endotelial e também tem propriedades angiogênica. A prostaglandina é produzida por células vasculares em resposta protetora á diferentes estímulos. A administração intravenosa de PGE1 tem sido relatada por melhorar parâmetros hemodinâmicos em pacientes críticos. Além de suas propriedades vasodilatadoras a PGE1 exerce efeitos sobre o óxido nítrico e na expressão de proteínas como o VEGF, alterando o diâmetro arteriolar e a permeabilidade microvascular. Assim a PGE1 pode representar uma opção terapêutica

para aumentar o NO e a expressão do VEGF, melhorando as condições clínicas dos indivíduos com isquemia (DOMINIK et al., 2005).

O fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor* - VEGF) tem sido foco de diversos estudos e seus efeitos vêm sendo testados em pacientes com DAC grave. Estudos utilizam diferentes doses, vetores e vias de administração do VEGF. O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) parece ser o fator central no processo da angiogênese no músculo esquelético. É considerado o mais importante promotor de crescimento capilar no músculo. Quando os níveis de VEGF estão baixos no músculo esquelético ocorre uma diminuição da densidade capilar e da relação de capilares por fibra muscular, acompanhado pelo aumento de apoptose destas células (LLOYD et al., 2005).

A hipóxia, normalmente relacionada com a redução do fluxo sanguíneo (isquemia) local, juntamente com agentes estimuladores da angiogênese como a PGE1 e o VEGF, parecem ser os mais potentes estímulos que iniciam a angiogênese de capilares.

Entretanto, no nosso estudo foi observado nos animais do grupo obesidade quando comparados com os animais do grupo controle, uma maior presença de capilares neoformados no tecido muscular esquelético, especialmente naqueles com isquemia e injeção intramuscular de PGE1, também associados há mais longos tempos de observação, 28 dias pós tratamento, sugerindo que o aumento do peso corporal e adiposidade possam ser um fator estimulador da angiogênese.

Esse resultado pode ser a combinação de uma série de fatores: 1- para suprir o tecido adiposo em desenvolvimento com oxigênio e nutrientes, a vasculatura responde aumentando o número e/ou tamanho dos vasos sanguíneos, estando o processo de adipogênese rigidamente associado com o de angiogênese; 2- o fornecimento de oxigênio diminuiu no tecido adiposo hipertrófico e a densidade de macrófagos e de citocinas aumentados, sendo esses fatores naturais estimuladoras da angiogênese; 3- a constante situação de inflamação encontrada na obesidade, gerando o estímulo de reparação tecidual que é dependente do processo de angiogênese; 4- o sobrepeso gerar um estresse muscular com conseqüente liberação de fatores angiogênicos para suprir a demanda metabólica do tecido; 5- e o fato do próprio tecido adiposo ser um

órgão endócrino capaz produzir e secretar uma série de substâncias com poder angiogênico (BOULOUMIÉ et al., 2011; EIBEL et al., 2010; LEDOUX et al., 2008; LIJNEN, 2008; REHMAN et al, 2003)

Antes considerado mero e passivo depósito de triacilglicerol e ácidos graxos livres, hoje o tecido adiposo é visto como importante órgão endócrino e parácrino, mantendo intensa comunicação com os demais órgãos e sistemas orgânicos. Produtor de diversas substâncias pró-inflamatórias, peptídeos e proteínas bioativas, denominadas adipocitocinas. As adipocitocinas influenciam uma variedade de processos fisiológicos, entre eles, o controle da ingestão alimentar, a homeostase energética, a sensibilidade à insulina, a angiogênese, a proteção vascular, a regulação da pressão e a coagulação sanguínea. Alterações na secreção de adipocitocinas, conseqüentes à hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos, poderiam constituir situação relacionada à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações (GUIMARÃES et al., 2007).

Algumas adipocitocinas contribuem para injúria vascular, resistência insulínica e aterogênese como: TNF-alfa, IL-6, leptina, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI)-1, angiotensinogênio, resistina e proteína C-reativa (PCR), e algumas possuem ação protetora contra inflamação vascular e resistência insulínica, dentre as quais figuram adiponectina e o óxido nítrico (GOMES, 2010).

O tecido adiposo é altamente vascularizado e muitos fatores angiogênicos são secretadas pelo tecido adiposo, incluindo fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento placentário (PIGF), angiopoetinas, FGFs, TNF, PAI-1, proteases e o mais importante deles o VEGF (LEDOUX, 2008). Fator esse que foi estudado em nossa pesquisa e observado através de técnica de imunohistoquímica a expressão desse fator de crescimento pela a marcação de capilares e vasos de maior calibre em nosso material, mas uma vez nos fazendo acreditar que houve o processo angiogênico no nosso estudo.

7 CONCLUSÃO

O período de dieta de cafeteria foi eficaz em induzir a obesidade nos animais, gerando um aumento na adiposidade total e alterando o perfil de triglicerídeos plasmáticos negativamente.

A administração de PGE1 alterou a morfologia do músculo nos membros isquêmicos dos ratos obesos observados aos 28 dias levando a uma redução na área da fibra e um aumento no número de capilares, o que gerou uma razão capilar/fibra muscular maior.

Estes resultados nos permitem concluir que a PGE1 na condição estudada apresentou uma boa efetividade, porém estudos clínicos em seres humanos necessitam ser realizados para atestar estes efeitos.

REFERÊNCIAS

Abo-Auda, W.; Benza, R.L. Therapeutic angiogenesis: review of current concepts and future directions. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, 22: 370-82, 2003.

Almeida, F.N.; Almeida, K.N.; Mais, L.N.; Nauchbar, R.T.; Natali, M.R.M.; Moraes, S.M.F. A resposta do peso e da composição corporal à inclusão da dieta de cafeteria e treinamento físico aeróbio em diferentes fases do desenvolvimento. **Ciência, Cuidado e Saúde**, 7: 39-44, 2008.

Barbosa, J.P.A.B.; Berengueri, M.F.; Rodrigues, L.B.C.C.; Miranda, A.S.; Gobbo, L.A.; Cucato, G.G.; Forjaz, C.L.M.; Marucci, M.F.N.; Ritti-Dias, R.M. Associação de comorbidades e hábitos não saudáveis com a capacidade de caminhada em pacientes com claudicação intermitente. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, 25 (2): 277-84, 2011.

Becker, C. **Angiogênese induzida por VEGF em ratos submetidos ao transplante celular: Estudo em modelo de isquemia/reperfusão no coração** [Tese - Doutorado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 1994.

Bouloumie, A.; Drexler, H.C.A.; Lafontan, M.; Busse, R. Leptin, the Product of Ob Gene, Promotes Angiogenesis. **Circulation Research**. 83:1059-66, 1998;

Calux, N.M.C.T. **Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino. Estudo imunohistiquímico comparativo entre dois marcadores vasculares** [Tese - Mestrado], São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 1998.

Cao, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**. 117 (9): 2362- 68, 2007.

Chae, J.K.; Kim, I.; Lim, S.T.; Chung, M.J.; Kim, W.H.; Kim, H.G.; Ko, J.K.; Koh, G.Y. Coadministration of Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 20: 2573-8, 2000.

Clover, A.J.P.; McCarthy, M.J. Developing strategies for therapeutic angiogenesis: vascular endothelial growth factor alone may not be the answer. **British Journal of Plastic Surgery**, 56: 31-4, 2003.

Couffinhal, T.; Dufourcq, P.; Daret, D.; Duplaà, C. Les mécanismes de l'angiogenèse. Applications médicales et thérapeutiques. **La Revue de Médecine Interne**, 22: 1064-82, 2001.

Darland, D.C. ; D'Amore, P.A. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. **The Journal of Clinical Investigation**, 103(2): 157-8, 1999.

Diemen VV, Trindade EN, Trindade MRM. Modelo experimental para induzir obesidade em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** ,21(6): 425-29, 2006.

Donnelly, R.; Yeung, J.M.C. Therapeutic angiogenesis: a step forward in intermittent claudication. **Lancet**, 359: 2048-50, 2002.

Eibel B, Rodrigues CG, Giust II, Nesralla IA, Prates PRL, Sant`ana RT, Nardi NB, Kalil AK. Terapia gênica para cardiopatia isquêmica: revisão de ensaios clínicos. **Revista Brasileira Cirurgia Cardiovascular**, 26(4):635-46, 2011.

Emanuelli C, Madeddu P. Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. **British Journal of Clinical Pharmacology**. 133: 951-8, 2001.

Esaki, J.; Sakaguchi, H.; Marui, A.; Bir, S.C., Arai, Y.; Huang, Y.; Tsubota, H.; Kanaji, Ikeda, T.; Sakata, R. Local Sustained Release of Prostaglandin E1 Induces Neovascularization in Murine Hindlimb Ischemia. **Circulation Journal**, 73: 1330-36. 2009.

Ferreira, M.J.; Barroso, P.; Duarte, N. Doença arterial periférica. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, 26: 502-9, 2010.

Folkman, J.; Shing, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**. 267:1031-4, 1992.

Folkman, J. Clinical applications of research on angiogenesis. **The New England Journal of Medicine**, 333: 1757-63, 1995.

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, 285: 1182-6, 1971.

Frisbee, J.C. Vascular function in the metabolic syndrome and the effects on skeletal muscle perfusion: lessons from the obese Zucker rat. **Essays in Biochemistry**, 42: 145-61, 2006.

Gama, A.D. **Etiopatogenia e evolução da doença aterosclerótica**. In: **Brito Cirurgia Vascular**. Ed. Revinter. Rio de Janeiro, 1 ed: 129-38, 2001.

Gomes, F.; Telo, D.F.; Souza, H.P.; Nicolau, J.C.; Halpern, A.; Serrano Jr., C.V. Obesidade e Doença Arterial Coronariana: Papel da Inflamação Vascular. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, 94(2): 273-79, 2010.

Gonçalves, S.B. Efeito **do VEGF na angiogênese pulpar e na apoptose**. [Tese - Doutorado], Bauru (SP); Universidade de São Paulo; 2006.

Goularte, J.F. **Efeitos da modificação alimentar e exercício físico sobre alterações produzidas pela dieta de cafeteria em ratas.** [Dissertação - Mestrado], Porto Alegre (RS); Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

Gounis, M.J.; Spiga, M.G.; Grahan, R.M.; Wilson, A.; Haliko, S.; Lieber, B.B.; Wakhloo, A.K.; Webster, K.A. Angiogenesis is confined to the transient period of VEGF expression that follows adenoviral gene delivery to ischemic muscle. **Gene Therapy**, 12(9): 762-71, 2005.

Haider, D.G.; Bucek, R.A.; Giurgea, A.G.; Maurer, G.; Glogar, H.; Minar, E.; Wolzt, M.; Mehrabi, M.R.; Baghestanian, M. PGE1 analog alprostadil induces VEGF and eNOS expression in endothelial cells. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 289: 2066-72, 2005.

Henry, T. Therapeutic angiogenesis. **British Medical Journal**, 318: 1536-9, 1999.

Hiatt, W.R. Drug therapy: medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. **The New England Journal of Medicine**, 344(21): 1608-21, 2001.

Isner, J.M.; Asahara, T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. **The Journal of Clinical Investigation**, 103(9): 1231-6, 1999.

Kalil, R.A.K.; Salles, F.B.; Giusti, I.I.; Rodrigues, C.G.; Han, S.W.; Sant`Ana, R.T.; Ludwig, E.; Grossman, G.; Prates, P.R.L.; Sant`Ana, J.R.M.; Teixeira Filho, G.F.; Nardi, N.B.; Nesralla, I.A. Terapia Gênica com VEGF para angiogênese na angina refratária: ensaio clínico fase I/II. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, 25(3): 311-321, 2010.

Kenpinas, W.D. **O desenvolvimento do sistema vascular.** In: **Maffei Doenças Vasculares Periféricas.** Ed. MEDSI. Rio de Janeiro, 2 ed: pg 3-17, 2002.

Ledoux, S.; Queguiner, I.; Msika, S.; Calderari, S.; Rufat, P.; Gasc, J.M.; Corvol, P.; Larger, E. Angiogenesis Associated With Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue in Severe Human Obesity. **Diabetes**, 57: 3247-57, 2008.

Lijnen, R.H. Angiogenesis and obesity. **Cardiovascular Research**, 78: 286-293, 2008.

Lindner, V.; Macing, T. The putative convergent and divergent natures of angiogenesis and arteriogenesis. **Circulation Research**, 89: 747-8, 2001.

Lloyd, P.G.; Prior, B.M.; Li, H.; Yang, H.T.; Terjung, R.L. VEGF receptor antagonism blocks arteriogenesis, but only partially inhibits angiogenesis, in skeletal muscle of exercise-trained rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, 288: 759- 68, 2005.

Matsuzawa, Y. White adipose tissue and cardiovascular disease. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, 19(4): 637-47, 2005.

Mehrabi, M.R.; Ekmekcioglu, C.; Stanek, B.; Thalhammer, T.; Tamaddon, F.; Pacher, R.; Steiner, G.E.; Wild, T.; Grimm, M.; Spieckermann, P.G.; Mall, G.; Glogar, H.D. Angiogenesis stimulation in explanted hearts from patients pré-treated with intravenous prostaglandin E (1). **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, 20(4): 465-73, 2001.

Mehrabi, M. R.; Serbecic, N.; Tamaddon, F.; Kaun, C.; Huber, K.; Pacher, R.; Wild, T.; Mall, G; Wojta, J.; Glogar, H. D. Clinical and experimental evidence of prostaglandin E1-induced angiogenesis in the myocardium of patients with ischemic heart disease. **Cardiovascular Research**, 56(2): 214-24, 2002.

Mehrabi, M. R.; Serbecic, N.; Tamaddon, F.; Pacher, R.; Horvath, R.; Mall, G.; Glogar, H. D. Clinical benefit of prostaglandin E1-treatment of patients with ischemic heart disease:stimulation of therapeutic angiogenesis in vital and infarcted myocardium. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 57: 173-8, 2003.

Menezes, E. F. **Efeito da indução de obesidade pela dieta de cafeteria a partir dos 21 dias de idade sobre a estrutura e o desenvolvimento folicular de ratas Wistar**. [Dissertação - Mestrado], Porto Alegre (RS); Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

Moreschi Jr., D.; Fagundes, D. J.; Amada, L. E. B.; Hernandez, L.; Moreschi, H. K. Efeitos da prostaglandina E1 (PGE1) na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos: estudo histológico. **Jornal Vascular Brasileiro**, 6: 316-324, 2007.

Pacher, R.; Stanek, B.; Hülsmann, M.; Sinzinger, H. Effect of prostaglandin E1 infusion in severe chronic heart failure. **Prostaglandins**, 53: 221-35, 1997.

Pandya, N.M.; Dhalla, N.S.; Santani, D.D. Angiogenesis – a new target for future therapy. **Vascular Pharmacology**, 44: 265-74, 2006.

Rehman, J.; Considine, R. V.; Bovenkerk, J. E.; Li, J.; Slavens, C. A.; Jones, R.; March, K. L.; Obesity Is Associated With Increased Levels of Circulating Hepatocyte Growth Factor. **Journal of the American College of Cardiology**, 41 (8): 1408–13, 2003.

Sarkar, K.; Semenza, G. L. Physiological and Therapeutic Vascular Remodeling Mediated by Hypoxia-Inducible Factor 1. **Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering**, 6 (6): 111-125, 2011.

Shibata, R.; Ouchi, N.; Kihara, S.; Sato, K.; Funahashi, T.; Walsh, K. Adiponectin Stimulates Angiogenesis in Response to Tissue Ischemia through Stimulation of AMP-activated Protein Kinase Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, 279(27): 28670-4, 2004.

Shyu, K.G.; Chang, H.; Wang, B.W.; Kuan, P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. **The American Journal of Medicine**, 114: 85-92, 2003.

Speck, N.M.G. **Influência do estadiamento clínico do adenocarcinoma endometrial na angiogênese** [Tese - Doutorado], São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, 1999.

Stapleton, P.A.; James, M.E.; Goodwill, A.G.; Frisbee, J.C. Obesity and vascular dysfunction. **Pathophysiology**, 15(2): 79-89, 2008.

Teruya, R. **Estudo de aspectos morfológicos e funcionais do rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão de músculo esquelético, sob a ação da pentoxifilina** [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, 2006.

Vidigal, J. **Estudo morfológico do músculo sóleo de ratos na isquemia e reperfusão sob oxigenação hiperbárica** [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, 2005.

Wahlberg, E.; Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. **Journal of Vascular Surgery**, 38: 198-203, 2003.

White, F. C.; Bloor, R. C. M.; Mckirnan, M. D.; Carroll, S. M.; Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. **Journal of Applied Physiology**, 85:1160- 68, 1998.

Yancopoulos, G.D.; Davis, S.; Galé, N.W.; Rudge, J.S.; Wiegand, S.J.; Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, 407: 242-8, 2000.

Yanovski, S. Z.; Yanovski, J. A. Obesity Prevalence in the United States — Up, Down, or Sideways?. **The New England Journal of Medicine**, 11: 364, 2011.

Yoshida, W. B. Angiogênese, arteriogênese e vasculogênese: tratamento do futuro para isquemia crítica de membros?. **Jornal Vascular Brasileiro**, 4 (4): 316-18, 2005.