

O PAPEL DA GLICAÇÃO INDUZIDO PELO METILGLIOXAL NA REGULAÇÃO DOS MECANISMOS DA ADIPOGÉNESE

Carvalho C¹, Silva A¹, Rodrigues T¹, Matafome P^{1,2}, Seiça R¹

1- Laboratório de Fisiologia, Instituto de Investigação Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

2- Instituto Politécnico de Coimbra, Escola Superior de Tecnologia da Saúde (ESTeSC), Departamento de Ciências Complementares, Coimbra, Portugal

Contactos

Morada: Pólo III da Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina, Subunidade 1, 1º andar, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 300-354 Coimbra, Portugal.

Telefone:

Email: carvalho.catarina@sapo.pt

Trabalho financiado por

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) – Pest-C/SAU/UI3282/2011

RESUMO

A obesidade constitui um dos principais problemas de saúde pública no Mundo. É possível distinguir dois tipos de tecido adiposo, o branco (TAB) e o castanho (TAC), tendo este funções de termorregulação *nonshivering* e o TAB funções metabólicas e endócrinas. No nosso trabalho demos destaque aos principais intervenientes do TAB e do TAC (PRDM16, C/EBP α e PGC-1 α) bem como a factores envolvidos na regulação do tónus vascular (angiotensinogénio e receptor AT1). Os produtos de glicação avançada contribuem para a ativação de vias intracelulares de inflamação e *stress*, sendo o metilglioxal (MG) um importante precursor das reações de glicação. Foi nosso objetivo perceber o envolvimento da glicação nos mecanismos de expansão do tecido adiposo com recurso ao estudo de parâmetros sistémicos e de diferenciação do tecido adiposo e factores vasoativos. Estudámos quatro grupos de ratos Wistar: um controlo (Ct), um ao qual foi administrado metilglioxal (MG), um mantido com dieta hiperlipídica (HFD) e um mantido com dieta hiperlipídica e administração de metilglioxal (HFDMG). Um grupo de ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo diabético tipo 2 não obeso com a mesma idade, também foi utilizado como controlo positivo. Avaliámos o perfil metabólico sistémico, factores de diferenciação do tecido adiposo e factores vasoativos. Não se verificaram alterações significativas nos factores de diferenciação dos adipócitos, com excepção da diminuição do PRDM16 nos ratos diabéticos e uma tendência para o aumento da sua expressão no tecido adiposo epididimal (TAE) do grupo HFD. Em relação aos factores vasoativos, o MG induziu uma maior expressão do receptor AT1 no TAE. Comparativamente a este grupo verificou-se uma diminuição da expressão do AT1 no grupo HFD, o que não foi observado no grupo HFDMG. No caso do angiotensinogénio, verificámos nos grupos com dieta e nos diabéticos uma tendência para valores inferiores ao grupo Ct. Neste contexto, evidenciamos que a glicação parece comprometer a adipogénese, especificamente o processo de *browning*, contrariando a adaptação induzida pela dieta gorda e que a glicação poderá afectar o sistema renina angiotensina, comprometendo desta forma a adaptação vasoactiva que ocorre na expansão do TA.

Palavras chave: Obesidade, AGE's, Metilglioxal, Adipocitoquinas , SRA

ABSTRACT

Obesity is one of the most concerning public health problems in the world. It is possible to distinguish two types of adipose tissue, white (WAT) and a brown one (BAT) which plays a nonshivering thermoregulation function, whilst the WAT focus on the metabolic and endocrine functions. In our work we highlighted the key players of WAT and BAT (PRDM16, C / EBP α and PGC-1 α), as well as the factors involved in the vascular tone regulation (angiotensinogen and AT1 receptor). Advanced glycation products contribute to the activation of intracellular pathways of inflammation and stress, with methylglyoxal (MG), a very important precursor of the glycation reactions. It was our main goal to understand the glycation involvement on the adipose tissue expansion mechanisms, using the study of systemic parameters, adipose tissue and vasoactive factors differentiation. We studied four groups of Wistar rats: a control (Ct), whom was administered methylglyoxal (MG) to, one who was maintained on a high fat diet (HFD) and another who followed a high fat diet along with an administration of methylglyoxal (HFDMG). A group of Goto-Kakizaki rats (GK), a non-obese diabetes type 2 from the same age, were also used as positive control. We evaluated the systemic metabolic profile, the differentiation of adipose tissue factors and also the vasoactive factors. There were no significant changes on the adipocyte differentiation factors with the exception of a PRDM16 decrease in diabetic rats, and a tendency to increase on the HDF group of epididymal adipose tissue (EAT). In relation to the vasoactive factors, the MG induced a higher expression of the AT1 receptor in EAT. Comparing to this group, we observed a decrease of the AT1 expression in the HFD group, the same was not observed in the HFDMG group. In the case of angiotensinogen, it was found both on the diabetic group and on the one who followed a diet, that there was a tendency to lower values than the ones observed on the Ct group. In this context, we showed that glycation seems to impair adipogenesis, specifically the browning process, contrary the induced adaptation of the fat diet and also that glycation may affect the renin-angiotensin system, thus compromising the vasoactive adaptation that occurs in the expansion of adipose tissue.

Key words: Obesity, AGE's, methylglyoxal, adipokines, RAS

INTRODUÇÃO

A obesidade constitui um dos principais problemas de saúde pública no Mundo sendo um fator de risco, particularmente quando associado a resistência à insulina, para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2). Associa-se igualmente a doenças cardiovasculares, distúrbios biliares (litíase e colecistites) e algumas neoplasias (especialmente as hormono-dependentes e as colorrectais), estando ainda em muitos países industrializados associada a vários problemas psicossociais(1). Apesar da atual consciência pública sobre as consequências da obesidade, a sua incidência continua a aumentar. Nos países ocidentais tem-se verificado um crescimento significativo na prevalência da obesidade, em consequência do desequilíbrio energético decorrente do aumento na ingestão calórica, somado à inatividade física e ao declínio concomitante do gasto energético(2). Algumas alterações coexistem comumente em indivíduos obesos como, hiperglicemia, dislipidemia e hipertensão arterial, que em conjunto compõem a chamada síndrome metabólica(1).

O tecido adiposo (TA) é uma estrutura complexa, heterogênea, constituída na sua maioria por adipócitos, células do mesênquima, fibroblastos, pré-adipócitos, células endoteliais e células do sistema imunitário (3). Anatomicamente, o tecido adiposo está distribuído sobretudo pelos compartimentos subcutâneo e visceral, localizando-se este sobretudo a nível mediastínico e abdominal (omental, mesentérico, peri-renal, retroperitoneal, parametrial, peri-ovárico e epididimal)(4). É possível distinguir dois tipos de tecido adiposo, o branco (TAB) e o castanho (TAC), com funções diferentes no organismo. A sua distribuição corporal é determinada geneticamente e dependente de fatores como idade, sexo e estado nutricional(5). O TAC particularmente relacionado com funções de termorregulação *nonshivering* (i.e produção de calor sem envolver contração muscular), caracteriza-se por ser multilocular com pequenas vesículas

lipídicas, com núcleo central e um grande número de mitocôndrias. Apresenta uma vascularização complexa, com inúmeros capilares sanguíneos, sendo quase exclusivamente enervado pelo sistema nervoso simpático (5). É mais abundante nos recém-nascidos diminuindo ao longo dos anos, existindo no adulto disperso no TAB, principalmente na região cervical e inter-escapular (4).

À caracterização do TAB como um órgão de armazenamento de energia, têm sido acrescentadas propriedades distintas que o tornam num verdadeiro órgão endócrino (6). Produz péptidos, hormonas e citocinas que, sendo a maioria produzida e segregada exclusivamente pelo tecido adiposo, são denominadas genericamente por adipocinas. Entre as diversas adipocinas segregadas, destacam-se a leptina, a adiponectina, a adiposina, a resistina, o factor de necrose tumoral α (TNF- α), o inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1), as interleucinas 1B, 6, 8, o fator 1 de crescimento tipo insulina (IGF-1), o fator de quimioatração de monócitos (MCP-1), a visfatina, fatores angiogénicos e vasoativos (fator de crescimento do endotélio vascular, angiopoietina-2 e angiotensina II), entre outros (6). Com exceção quase única da adiponectina, a produção e secreção destes diversos fatores intensifica-se com a obesidade, sendo muitos deles, como o TNF- α , a resistina, o PAI-1, a IL-6 e o MCP-1, diretamente associados a resistência à insulina, hipercoagulabilidade e aterogénese que, por sua vez, têm sido relacionadas com hipertensão, inflamação, aumento do risco cardiovascular e acidentes tromboembólicos (6).

O aumento da massa gorda na obesidade é determinado pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia) (7). A hipertrofia do adipócito não é um processo ilimitado. Adipócitos muito grandes, além de esgotarem a capacidade de armazenamento, tornam-se mais lipolíticos, com o consequente

aumento dos ácidos gordos circulantes e a sua deposição ectópica em órgãos como o pâncreas endócrino, o músculo e o fígado, comprometendo a sua função (7).

Os adipócitos provêm de células-tronco mesenquimatosas multipotentes (*stem-cells*), residentes no estroma do tecido adiposo. Estas células multipotentes tornam-se pré-adipócitos quando perdem a capacidade de se diferenciar em outras linhagens celulares. Esta fase inicial da diferenciação do adipócito é conhecida como determinação ou comprometimento à qual se segue a segunda fase conhecida como diferenciação terminal; os pré-adipócitos adquirem as características de adipócitos maduros, isto é, passam a ter a capacidade de síntese, armazenamento, libertação de lípidos e funções endócrinas (8).

Um grande avanço nesta área foi a demonstração de que os adipócitos castanhos e brancos não se desenvolvem a partir de precursores comuns. A diferenciação do tecido adiposo castanho é regulada pelo fator regulador de transcrição PRM16, sendo este capaz de controlar de forma bidirecional, a diferenciação de miócitos e adipócitos. A ausência de PRDM16 nos precursores do tecido adiposo castanho (TAC) promove a miogénese, enquanto a sua expressão nos mioblastos estimula a adipogénese (9). Nos últimos anos têm surgido vários estudos, *in vivo* e em culturas celulares, sobre as vias moleculares que controlam o processo de diferenciação dos adipócitos. O PPAR γ (Recetor γ activado pelos proliferadores Peroxissomais) e vários membros da família dos fatores de transcrição C/EBP(α, γ, δ) são considerados elementos essenciais no processo de diferenciação dos adipócitos (8). O início da adipogénese depende, normalmente, da inibição da via das proteínas sinalizadoras Wnt (wingless), uma família de glicoproteínas, na qual a Wnt10b é expressa em pré-adipócitos mas não em adipócitos. Esta via impede a diferenciação dos adipócitos brancos e castanhos através do bloqueio do PPAR γ e o C/EBP α . Após a indução da adipogénese, a expressão de

Wnt10b é rapidamente inibida(8). O PPAR γ tem um papel central na adipogénese, nomeadamente na diferenciação terminal dos adipócitos, uma vez que, na sua ausência, há perda do estado diferenciado com perda da acumulação lipídica e diminuição da expressão de marcadores característicos destas células (10). Os membros da família C/EBP (α, γ, δ) têm funções na ativação e manutenção de vários genes indutores da adipogénese, incluindo o PPAR γ . O C/EBP α é necessário para a diferenciação dos adipócitos brancos e desempenha um papel importante na regulação da sensibilidade à insulina no adipócito adulto(8).

Existem várias moléculas que regulam a diferenciação do TAC. Entre os fatores mais estudados é de interesse referir o PGC-1 α (PPAR γ coactivador-1 α) e o PRDM16 (PRD1-BF-RIZ *homologous domain-containing protein-16*) (11). O PGC-1 α é essencial para a síntese mitocondrial e estimulação do metabolismo oxidativo. A sua ablação genética resulta em incapacidade de termogénese adaptativa ao frio, por ausência de resposta a estimulação adrenérgica via cAMP. No entanto, muitos genes do TAC não dependentes da estimulação adrenérgica, e o próprio processo de diferenciação, mantêm-se inalterados apesar da ausência do PGC-1 α . Este facto sugere que, apesar do PGC-1 α ser um fator crucial na regulação da termogénese, não se apresenta como determinante essencial na identidade do TAC (11). O PRDM16 é um dos reguladores mais importantes no processo de diferenciação do TAC; a sua presença é obrigatória para a manutenção da identidade e função do TAC, uma vez que, a depleção deste fator induz a perda de quase todas as características específicas dos adipócitos castanhos (11). A sua ação depende da interação direta com o PPAR α e γ e com os PGC-1 α e β ; a sua expressão ectópica nas células mesenquimatosas, incluindo as precursoras dos adipócitos brancos, induz um completo programa de diferenciação em adipócitos castanhos, incluindo a activação de genes termogénicos, genes mitocondriais, entre

outros genes específicos do TAC (12). Apesar de se conhecer a relação com todos estes fatores, o mecanismo exato que permite ao PRDM16 controlar a adipogénese ainda não é conhecido(11). Além dos fatores já descritos, as *bone morphogenic proteins*(BMPs) surgiram como potentes reguladores da adipogénese branca e castanha. As BMP-2 e 4 induzem a diferenciação dos adipócitos brancos enquanto a BMP-7 está envolvida na diferenciação de adipócitos castanhos. As BMP's atuam a montante dos fatores de transcrição SMAD que levam a perda da capacidade de diferenciação noutras células(13).

A vascularização do tecido adiposo permite trocas gasosas, transporte lipídico, de forma a serem armazenados/libertados pelos adipócitos, e transporte dos seus produtos de secreção como as adipocinas. Assim a angiogénese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, apresenta-se como crucial na resposta à expansão do tecido adiposo (6).

A obesidade é caracterizada como um estado de inflamação crónica de baixo grau diretamente proporcional ao aumento da adiposidade corporal (3). Alguns estudos sugerem que os adipócitos hipertrofiados comprimem a vasculatura do tecido reduzindo o aporte de oxigénio. A hipoxia consequente estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, a fim de aumentar a angiogénese e o fluxo sanguíneo (14). Desta forma cria-se um ciclo vicioso entre obesidade e inflamação, induzidas por estas alterações no tecido adiposo (3).

O Metilglioxal (MG) modifica proteínas e lípidos intracelulares originando produtos avançados de glicação (AGEs) estando, assim, implicado na ativação de vias de *stress* celular e perda da viabilidade celular(15). Os AGEs constituem um grupo de diversos compostos resultantes da glicação não-enzimática de proteínas, lípidos e ácidos

nucleicos com capacidade de formar ligações cruzadas entre proteínas, alterando a sua estrutura e função, nomeadamente na matriz extra-celular, na membrana basal e no endotélio. Têm ainda a capacidade de interação com uma variedade de recetores da superfície celular, capaz de activar eventos intracelulares pró-oxidantes e pró-inflamatórios (16).

Um dos mecanismos patogénicos propostos para o envolvimento do Sistema Renina Angiotensina (SRA) na obesidade parte da capacidade do tecido adiposo expressar e segregar angiotensinogénio (AGt), que constitui substrato da renina, sendo convertido a angiotensina I, precursor da angiotensina II, um potente vasoconstritor. O tecido adiposo é, pois, uma fonte extra-hepática de AGt, cujo teor circulante está aumentado em indivíduos obesos, já que este é regulado por fatores nutricionais. O aumento da produção de AGt pelo TA parece contribuir para o aumento do tecido adiposo; há estimulação da lipogénese e, através do PPAR γ , inibição da adipogénese e, conseqüentemente, hipertrofia dos adipócitos(16). A angiotensina II (AngII), para além da sua atividade vasoconstritora, aumenta o rolamento, a adesão e a migração dos leucócitos através de mediadores pró-inflamatórios vasculares. Actua também como uma forte moduladora da produção de espécies reativas de oxigénio na vasculatura e estimula a NADPH oxidase, a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) e a infiltração de macrófagos conduzindo, assim, a remodelação da vasculatura e disfunção endotelial (14).

OBJECTIVOS

Como já tivemos oportunidade de abordar, a adipogénese e a irrigação são mecanismos fundamentais na fisiologia do tecido adiposo. Os AGEs contribuem para a ativação de vias intracelulares de inflamação e *stress* conduzindo a uma perda da viabilidade celular. Tendo em conta o descrito anteriormente, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do metilglioxal nos mecanismos de adaptação da adipogénese e dos fatores vasoactivos do tecido adiposo subcutâneo e epididimal e, desta forma, avaliar o papel da glicação na expansão do tecido adiposo, com implicações para o metabolismo da glicose e dos lípidos e na sensibilidade à insulina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes utilizados

Com excepção daqueles onde é especificado, todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos à Sigma (EUA) ou Merck (Alemanha). Foram usados os anticorpos anti-angiotensin II type 1 receptor abcam 9391 UK, Anti-Angiotensinogen abcam ab108334 UK, anti-C/EBP α abcam ab40764 UK, anti-PRDM16 abcam ab106410 UK e anti-PGC1 α abcam ab191838 UK.

Modelos animais

Foram utilizados 4 grupos de ratos Wistar de 12 meses de idade (n= 5/grupo); grupo controlo (Ct); grupo mantido com dieta hiperlipídica (HFD 40% triglicerídeos SAFE, França) grupo com administração de metilglioxal (MG), grupo com dieta e MG (HFDMG). Foi igualmente estudado, como modelo positivo de glicação, um modelo animal não obeso de diabetes tipo 2, os ratos Goto-Kakizaki (GK), da mesma idade (n=5/grupo) Os animais, obtidos das nossas colónias da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24°C), humidade (50-60%) e luz (ciclos de 12h de luz e escuridão), com acesso livre a água e comida. Os protocolos experimentais envolvendo animais estiveram de acordo com os protocolos internacionais de manutenção e utilização de animais de laboratório. Além disso, os procedimentos foram realizados por utilizadores licenciados (Curso validado pela Federação Europeia das Associações Científicas de Experimentação Animal – FELASA, com certificado da Direcção Geral de Veterinária).

A dieta hiperlipídica e o metilglioxal foram administrados, durante 4 meses (dos 8 aos 12 meses de idade). O MG, na dose de 100mg/Kg/dia, foi diluído na água do biberão, com controlo do volume ingerido diariamente e monitorização periódica do peso corporal.

Análises *in vivo*

Durante o tratamento, foi monitorizado o consumo de ração e de água bem como o peso corporal. No final do tratamento, a glicemia, em jejum (16-18 horas) e na 1^a e 2^a horas após administração intraperitoneal de glicose (1.8g/Kg), foi medida na veia da cauda através do método da glicose oxidase, utilizando um glicómetro (Elite-Bayer SA, Portugal) com as respectivas tiras-teste. Com base nos valores obtidos na prova de tolerância à glicose intraperitoneal, foi calculada a área sob a curva (AUC).

Foi determinada, igualmente no sangue da veia da cauda, a percentagem de hemoglobina glicada (HbA1c), utilizando o sistema DCA2000+ (Siemens, Portugal).

Recolha das amostras

Recolha de sangue: No dia do sacrifício, as amostras de sangue foram recolhidas por punção cardíaca, após jejum de 16-18 horas, em animais anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/Kg, i.m., Parke-Davis, Ann Arbor, EUA) e cloridrato de clorpromazina (2.65 mg/Kg, i.m., Laboratórios Vitória, Portugal). Para a separação do soro e do plasma foram utilizados, respectivamente, tubos BD Vacutainer e BD Vacutainer K3E, com 5.4 mg de EDTA (BD Vacutainer, Reino Unido). Os sangues foram centrifugados a 35000 rpm, 10 minutos, a 4°C e o plasma e o soro foram aliquoteados e armazenados a -80°C.

Recolha de órgãos: Após a colheita de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tecido adiposo epididimal e subcutâneo foi imediatamente recolhido, lavado em solução isotónica (0.9% NaCl) e imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80°C.

Determinação dos níveis sistémicos de lípidos e insulina

Foram determinados, em jejum, os níveis sanguíneos de triglicerídeos, ácidos gordos livres e insulina utilizando respectivamente, um analisador automático (Olympus-Diagnóstica Portugal, Produtos de Diagnóstico SA, Portugal), o kit comercial Zenbio, EUA e o kit comercial Rat Insulin ELISA Kit, Mercodia, Suécia.

Determinação dos níveis de proteínas nos tecidos – *Western Blotting*

Preparação das amostras: Foram homogeneizadas secções de tecido adiposo epididimal e subcutâneo (300mg) em 1ml de tampão de lise (25mM Tris-HCl pH7.4; 150mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.5% SDS; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 20mM NaF; 2mM Na₃VO₄; 10mM β-glicerofosfato; 2.5mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 40μl de *cocktail* inibidor de proteases/g de tecido (Sigma, USA), pH7.7). Os homogeneizados foram depois sonicados e centrifugados a 14000 xg, durante 20 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados novamente, aliquotados e mantidos a -80°C. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de BCA.

SDS-PAGE: Foi adicionado o tampão de *loading* (62.5mM Tris, 1% SDS, 1.25 ml glicerol e 0.01% (w/v) *bromophenol blue*, pH6.8) aos extractos e estes foram separados de acordo com o peso molecular, por SDS-PAGE, num gel de acrilamida, utilizando um tampão de corrida (125mM Tris-base, 480mM glicina, 1% SDS, pH8.8). Foi utilizado o *Precision Plus Protein Standard* (Biorad, EUA) como marcador dos pesos moleculares. A percentagem de acrilamida variou entre os 8 e os 10%. Na polimerização foi utilizada acrilamida a 40% (Biorad, EUA) e as soluções tamponadas de *resolving* (0.75M Tris-HCl, 0.2% SD, pH8.8) e *stacking* (0.25M Tris-HCl, 0.2% SDS, pH6.8)

Transferência: Após separação por peso molecular, as amostras foram transferidas para uma membrana *polyvinylidene fluoride* (PVDF), utilizando um tampão de transferência (50mM CAPS, 2% NaOH, 10% metanol, pH11). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução TBST (250mM Tris, 1.5mM NaCl, pH7.6 + 1% Tween20), suplementada com 5% de albumina de soro bovino (BSA).

Marcação: As membranas foram utilizadas para a marcação de C/EBP, PRDM16, PGC1 α , receptor AT1 e AGt. Para tal, as membranas foram incubadas durante a noite, a 4°C, com os respectivos anticorpos. Depois de lavadas durante 30 minutos com solução TBST, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários (anti-coelho/ ratinho/ cabra; GE Healthcare, Reino Unido), durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois da lavagem, durante 1 hora, as membranas foram incubadas com o reagente ECL e reveladas num sistema VersaDoc Imaging System (Biorad, EUA). Os resultados foram analisados utilizando o *software* ImageQuant (Molecular Dynamics, EUA).

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média + erro padrão da média. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis com comparações múltiplas foi utilizado para testar as diferenças estatísticas entre os grupos, tendo sido considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Peso Corporal e ração consumida

De uma forma global, os ratos GK, aos 12 meses de idade, apresentaram um peso inferior aos ratos Wistar e uma maior quantidade de ração consumida. O grupo HFD apesar da menor quantidade de ração consumida apresentou um aumento significativo de peso em relação ao grupo Ct, o que não se verificou de forma tão marcada nos grupos MG e HFDMG. Este resultado sugere que a administração de MG inibe o ganho ponderal associado à dieta hiperlipídica (Tabela I).

Tabela I – Ração consumida, peso corporal, glicemia em jejum e às duas horas da PTGIP, HbA1c e triglicerídeos

Grupo	Ct	MG	HFD	HFDMG	GK
Ração (g/rato/dia)	22,9±0,7	24,3±1,6	15,1±1,1 **##	14,4±0,7 **##	25,7±0,6 \$\$\$&&&
Peso (g)	508,8±11,4	508,9±18,4	652,7±35,8 **##	571,6±27,3	398,7±7,7 *#\$\$\$&&&
Glicemia jejum (mg/dl)	68,5±2,0	70,6±1,4	70,9±2,0	71,1±1,6	91,7±3,0 ***#&
HbA1c (%)	3,2±0,1	3,3±0,1	3,3±0,1	3,5±0,1	5,6±0,4 ***##\$\$\$&&&
Glicemia 2h (mg/dl)	77,0±3,1	84,8±2,2	123,6±8,4 **##	143,6±9,7 ***###	305,4±14,8 ***###\$\$\$&&&
Triglicerídeos (mg/dl)	77,2±6,4	69,3±10,7	77,8±5,4	62,3±3,2	160,1±23,1 ***###\$\$\$&&&

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

Os resultados são apresentados como média + erro padrão médio.

*: diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; & diferente de HFDMG. 1 símbolo: p<0,05; 2 símbolos: p<0,01; 3 símbolos: p<0,001

Perfil glicêmico e Hemoglobina A1c

Os ratos diabéticos apresentaram glicemia em jejum mais elevada do que os restantes grupos e acentuada intolerância à glicose (Figura 1, Tabela I).

No grupo MG não se verificaram alterações significativas do perfil glicêmico comparativamente ao grupo Ct (Tabela I; Figura 1).

Os ratos dos grupos HFD e HFDMG não apresentaram alterações relevantes da glicemia em jejum em relação ao grupo Ct (Tabela I). No entanto, apresentaram um aumento da área sob a curva registrada durante a PTGIP e da glicemia às 2 horas, sendo este efeito mais pronunciado no grupo HFDMG (Figura 1, Tabela I). Na área sob a curva verificou-se, ainda, uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos HFD e HFDMG, mostrando que a administração concomitante de MG acentuou a diminuição da tolerância à glicose (Figura 1).

Relativamente à hemoglobina glicada (HbA1c), o grupo GK foi o único grupo que apresentou alterações (Tabela I).

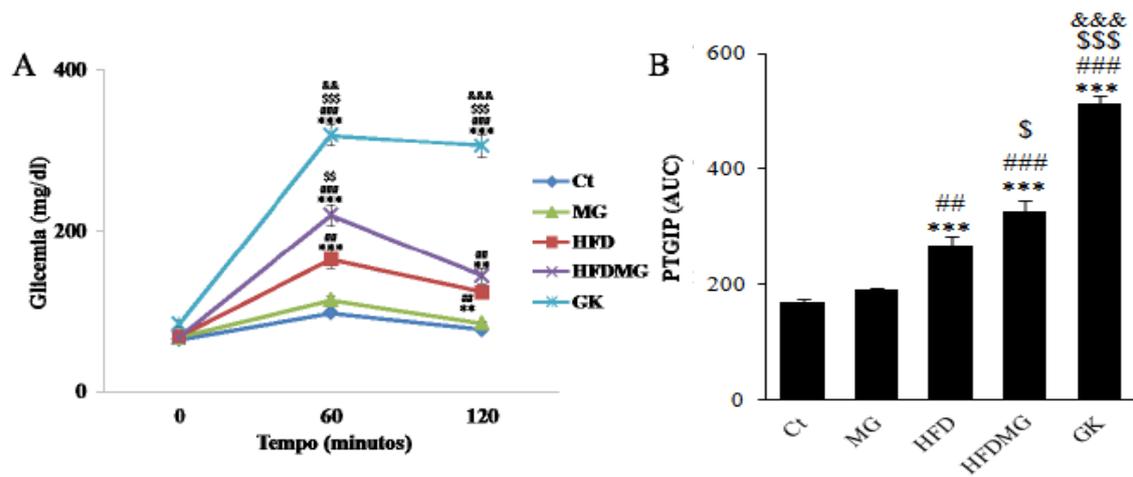


Figura 1 – Prova de tolerância à glicose intra-peritoneal (A) e área sob a curva (B). Verifica-se intolerância à glicose nos ratos com dieta, particularmente nos HFDMG, embora menor que nos ratos diabéticos.

Ct – grupo controle; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; & diferente de HFDMG. 1 símbolo: $p < 0,05$; 2 símbolos: $p < 0,01$; 3 símbolos: $p < 0,001$

Perfil lipídico

Os ratos GK apresentaram um aumento dos níveis sanguíneos de triglicerídeos (tabela 1) e de ácidos gordos livres (Figura 2-A). Não foram observadas alterações dos triglicerídeos nos restantes grupos, mas os níveis circulantes de ácidos gordos livres aumentaram no grupo HFDMG comparativamente ao grupo Ct, sugerindo que o metilglioxal pode influenciar o metabolismo lipídico e/ou a capacidade de armazenamento lipídico induzidos pela dieta gorda (Figura 2-A).

Insulinemia

Relativamente a taxa de insulina no sangue, não se verificaram alterações significativas nos grupos MG e HFD em comparação com o grupo controlo. No entanto, o mesmo não se verificou no grupo HFDMG, ocorrendo um aumento significativo (Figura 2-B). Já os ratos GK apresentaram uma diminuição marcada da insulinemia em jejum relativamente a todos os outros grupos, o que reflete a falência das células β -pancreáticas, característica deste modelo com esta idade (Figura 2-B).

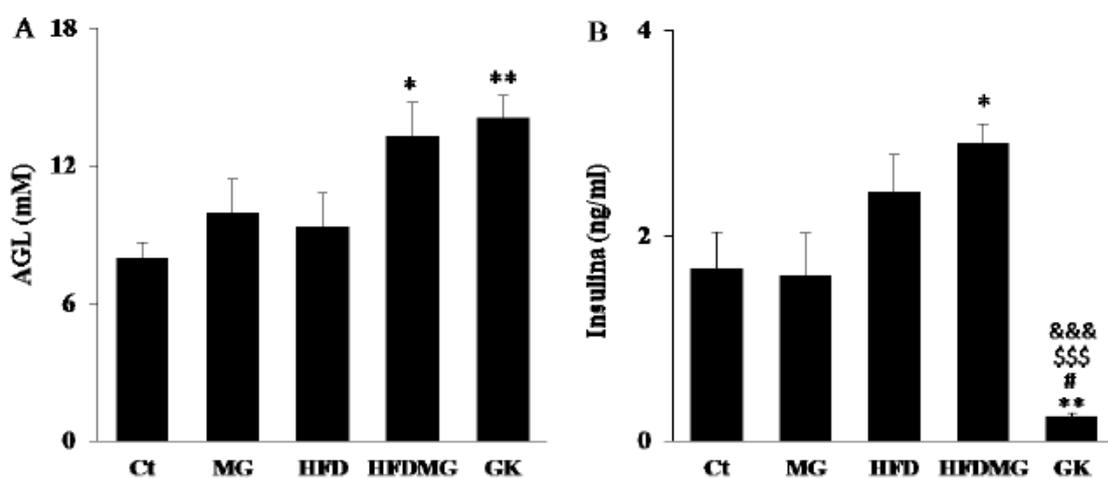


Figura 2 – Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres (AGL) (A) e insulinemia (B) no final do tratamento. Observa-se um aumento dos níveis de ácidos gordos livres circulantes e da insulina no grupo HFDMG e, nos ratos diabéticos, um aumento dos ácidos gordos livres circulantes e uma diminuição acentuada da insulinemia.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; & diferente de HFDMG. 1 símbolo: $p < 0,05$; 2 símbolos: $p < 0,01$; 3 símbolos: $p < 0,001$

Fatores de diferenciação do tecido adiposo

O **C/EBP**, como já tivemos oportunidade de referir, é fundamental na ativação e manutenção de vários genes indutores da adipogénese. Não se verificaram alterações significativas da expressão do **C/EBP** nos diferentes grupos, em comparação com o grupo Ct, quer no tecido adiposo epididimal, quer no subcutâneo (Figura 3).

Determinámos o **PGC1 α** e não se verificaram alterações significativas em nenhum dos grupos experimentais, em comparação com o grupo controlo, no tecido adiposo epididimal. No tecido adiposo subcutâneo, observa-se um ligeiro aumento da expressão do **PGC1 α** nos grupos com MG e nos ratos GK, ainda que não suportado estatisticamente. (Figura 3)

Relativamente ao **PRDM16**, regulador no processo de diferenciação do TAC, verificou-se no grupo de ratos GK uma diminuição da sua expressão no tecido adiposo epididimal, em relação aos grupos MG, HFD e HFDMG. Observou-se uma tendência para o aumento da sua expressão no tecido adiposo epididimal do grupo HFD, porém, não apresentando diferenças estatisticamente significativas. (figura 3)

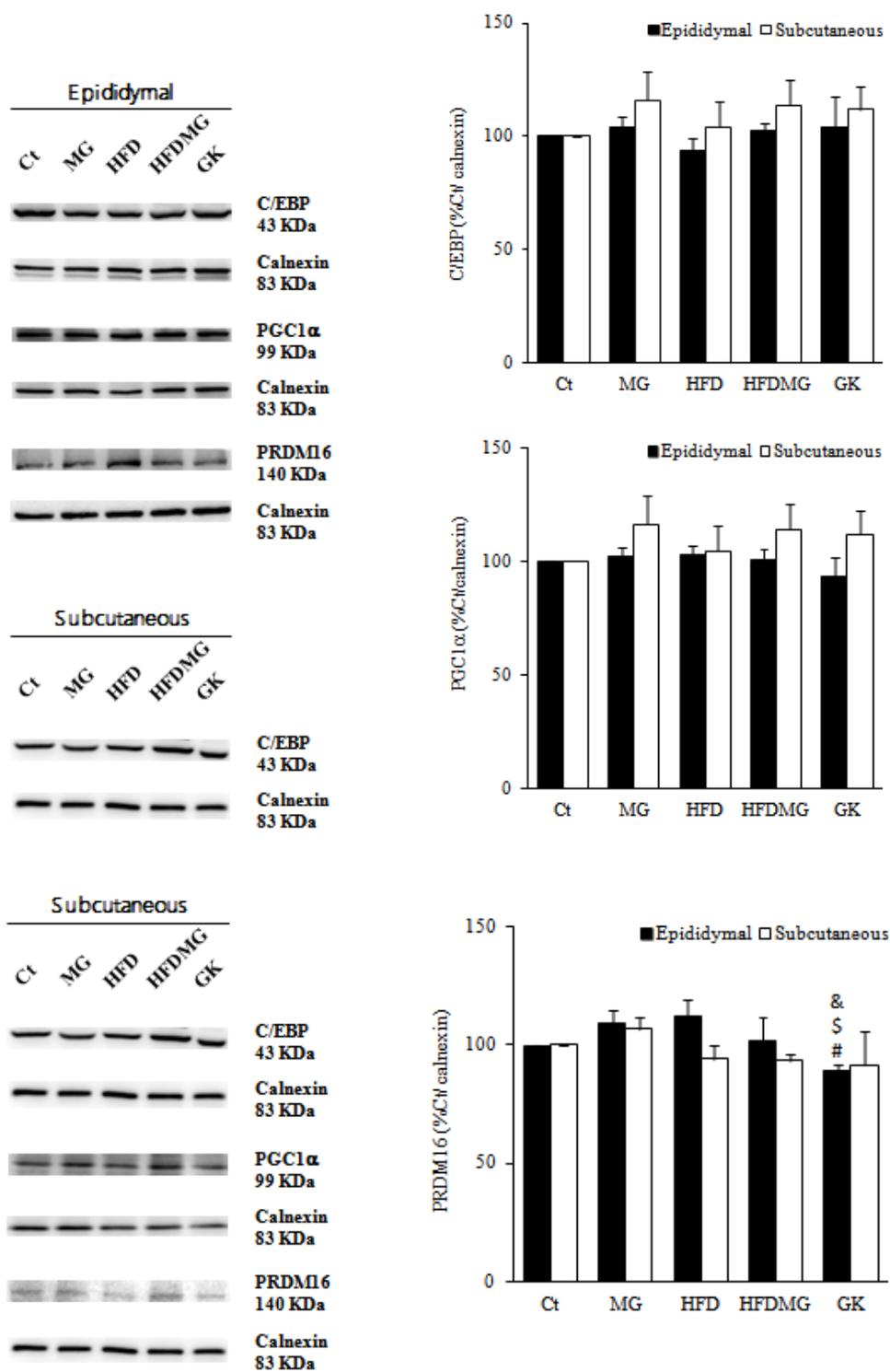


Figura 3 – Expressão do C/EBP, PGC1α e PRDM16 no tecido adiposo epididymal e subcutâneo quantificada por *Western Blotting*.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

* diferente de Ct; # diferente de MG; \$ diferente de HFD; 1 símbolo: $p < 0,05$

Fatores Vasoativos

Determinámos os níveis do receptor **AT1** e verificámos que o grupo **MG** apresenta um aumento dos níveis de **AT1**, ainda que não significativamente estatístico, no tecido adiposo epididimal, comparativamente ao grupo **Ct**. Já o grupo mantido com dieta gorda (**HFD**) e o grupo diabético (**GK**) têm ambos uma diminuição da sua expressão, em comparação com o grupo **MG**. Além disso, a diminuição observada no grupo **HFD** não se verificou no grupo **HFDMG**, sugerindo que o **MG** promove a expressão do receptor da angiotensina II (Figura 4).

O tecido adiposo é considerado uma fonte extra-hepática de **angiotensinogénio**. Não observámos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, mas uma tendência para a diminuição da sua expressão nos grupos **HFD**, **HFDMG** e **GK**, tanto no tecido adiposo epididimal como no subcutâneo (Figura 4).

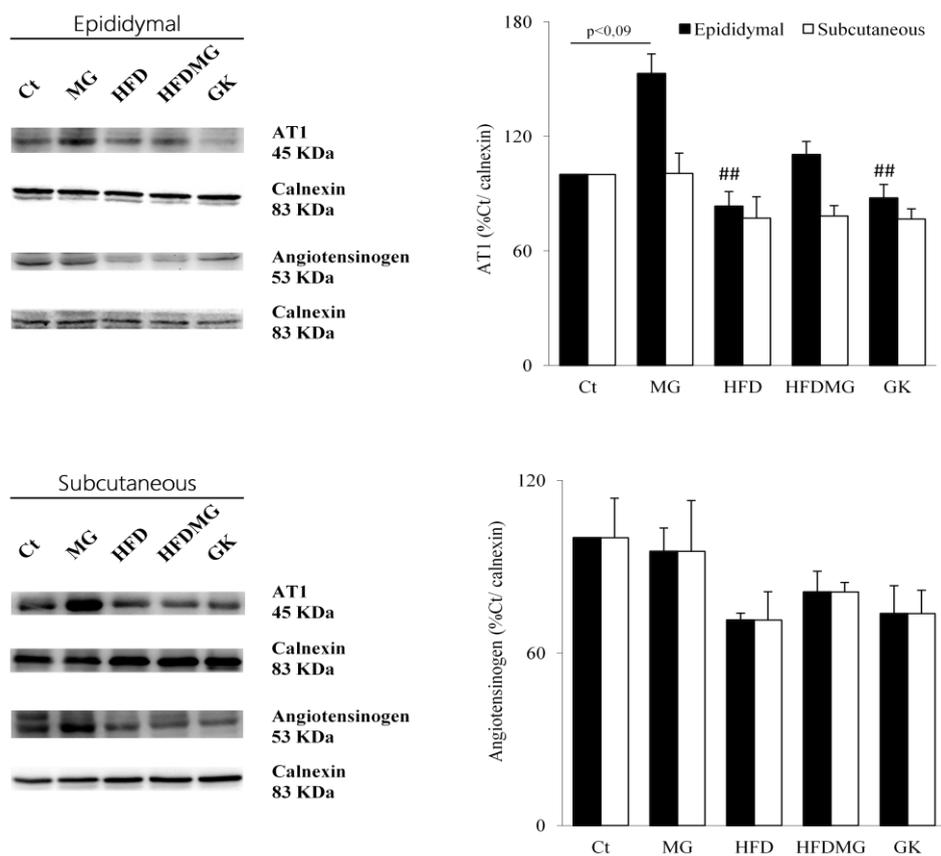


Figura 4 – Expressão do receptor AT1 e do angiotensinogénio no tecido adiposo epididymal e subcutâneo quantificada por *Western Blotting*.

Ct – grupo controlo; MG – Metilglioxal; HFD – Dieta hiperlipídica; HFDMG – Dieta hiperlipídica + metilglioxal; GK – Ratos Goto-Kakizaki.

diferente de MG; 2 símbolos: $p < 0,01$

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objectivo perceber o envolvimento da glicação nos mecanismos de expansão do tecido adiposo com recurso ao estudo de parâmetros sistémicos, parâmetros de diferenciação do tecido adiposo e factores vasoativos.

Em relação aos parâmetros sistémicos, os nossos resultados permitiram-nos aferir que a administração de MG a animais mantidos com dieta gorda cursa com intolerância à glicose e aumento dos níveis circulantes de ácidos gordos livres e insulina. Os ratos GK apresentaram um quadro de dismetabolismo com hiperglicemia em jejum, marcada intolerância à glicose e aumento de hemoglobina glicada, aumento dos níveis circulantes de triglicérides e ácidos gordos.

O nosso grupo estudou anteriormente ratos Wistar submetidos a administração de MG durante 14 semanas. Não houve alterações do perfil glicémico, mas foi possível observar alterações estruturais na microvasculatura do tecido adiposo (deposição de produtos glicosados, fibróticos e recrutamento de macrófagos), com decréscimo da irrigação, alterações de parâmetros apoptóticos e factores angiogénicos, associados a hipoadiponectinemia. Mais ainda, a administração de MG levou ao decréscimo do rácio VEGF/Ang-2, desregulação da proliferação endotelial e formação de capilares aberrantes, podendo assim o MG estar envolvido na diminuição da irrigação e hipoxia do tecido adiposo (17). Num outro estudo do nosso laboratório, igualmente com ratos Wistar, mas submetidos a MG durante 8 semanas, verificaram-se alterações menos evidentes na rede vascular, mas com aumento da acumulação de AGEs no tecido adiposo. Não se observou hipoadiponectinemia, expressão de moléculas quimioattractivas e recrutamento de macrófagos, nem alterações da glicemia (18).

Estes resultados sugerem que o MG pode induzir alterações na microcirculação, que dificultam a adaptação do TA a condições de hipoxia. O presente trabalho, o metilglioal, por si só, não é suficiente ou não tem um papel relevante no desenvolvimento de insulino-resistência mas, em condições de sobrecarga por dieta hiperlipídica, os dois mecanismos podem potencializar-se mutuamente.

O adipócito castanho tem origem numa linhagem celular que expressa o fator miogénico 5 (Myf-5), que também dá origem ao músculo esquelético. A sua capacidade termogénica é resultado da proteína termogenina ou *uncoupling 1* (UCP1), proteína transmembranar mitocondrial do TAC, que medeia o desacoplamento do gradiente de prótons da síntese de ATP. Desta forma, a oxidação de ácidos gordos e também de glicose é desviada para a produção de calor (19). O PRDM16 é o regulador chave do processo de diferenciação do TAC, especificando a sua diferenciação a partir da linhagem precursora comum ao mioblasto, e também da sua actividade termogénica. Tal como já foi referido, o PRDM16 atua como um potente co-ativador da atividade transcripcional do PGC1 α , PPAR γ e C/EBP (12). No TAB, são observados agrupamentos de células que expressam a UCP1, em resposta ao frio ou à estimulação simpática. Estas células são denominadas de adipócitos bege ou “brite” (*Brown from white*). Apresentam uma morfologia e funcionalidade semelhante ao TAC, no entanto, são consideradas células distintas. O adipócito bege não se origina da linhagem celular Myf-5 positiva, mas parece ter origem numa linhagem celular semelhante à célula muscular lisa residente no estroma vascular do TAB. Acredita-se, desta forma, que o adipócito bege apresente a capacidade de alternar o seu estado funcional entre armazenamento lipídico e dissipação de energia, de acordo com o estímulo a que é submetido (12). O TAC pode ser estimulado, não só pela ingestão alimentar, mas também pela exposição crónica ao frio (12). Estudos anteriores demonstraram que ratos

submetidos a dietas hipercalóricas, apresentavam hipertrofia dos adipócitos e aumento da função do TAC. Este mecanismo de termogênese induzida funcionaria como aparente adaptação fisiológica para tentar restringir o aumento de peso (5). De facto, estudos subsequentes permitiram verificar que a estimulação do TAC evitava o aumento de peso em ratos submetidos a dieta hipercalórica (20). No nosso estudo, verificámos que a dieta gorda no grupo (HFD), causa um ligeiro aumento da expressão do PRDM16 no tecido adiposo epididimal, o que permite especular que os adipócitos maduros podem ser estimulados a expressar um fenótipo células adiposas castanhas *like*, um processo conhecido por transdiferenciação ou *browning* (19). Os ratos GK foram os únicos que apresentaram uma diminuição significativa da expressão da PRDM16. Curiosamente, num trabalho anterior do nosso laboratório, a irisina sérica, uma miocina que induz a expressão da UCP-1 e a dissipação de energia sob a forma de calor no tecido adiposo subcutâneo, apresentava níveis marcadamente diminuídos nos ratos GK (21); alguns estudos sugerem que a disfunção oxidativa mitocondrial observada em estados de insulino-resistência esteja em parte, relacionada com a expressão reduzida de genes envolvidos na biogénese mitocondrial. Assim o TAB ao expressar PRDM16, pode ser um alvo promissor ao estímulo do dispêndio energético (11). Mais ainda o facto da administração conjunta de MG não ter este efeito sugere envolvimento da glicação nesta adaptação.

O PGC1 α foi originalmente identificado no TAC como um co-ativador do PPAR γ induzido pelo frio e, posteriormente, terá sido descoberto o seu envolvimento na biogénese mitocondrial e no metabolismo oxidativo. Estudos provaram que a ablação do PGC1 α resulta numa diminuição da capacidade termogénica (19). A expressão do PGC1 α e a estimulação da oxidação de ácidos gordos podem trazer benefícios para a regulação lipídica, pois o PGC1 α promove a expressão da glicerol cinase nos adipócitos

brancos. A presença desta cinase nestas células, normalmente desprovidas desta enzima, torna possível a hidrólise completa dos triglicéridos através de um ciclo triglicéridos/ácidos gordos (10).

Goossens e a sua equipa (2011) sugeriram que a angiogénese e a vascularização do tecido adiposo de indivíduos obesos poderão estar diminuídas, após encontrarem uma diminuição da expressão do PGC1 α e a presença de elevada PO₂ no tecido adiposo. A presença de tecido adiposo hiperóxico na obesidade, pode ser explicada por menor consumo de oxigénio a nível mitocondrial, conduzindo a menor expressão local do PGC1 α e, desta forma, inibição da expressão do VEGF e da angiogénese. Assim, poderá existir um paralelismo entre o estado hiperóxico do TA e a reduzida angiogénese e vascularização do TA, ou seja, um baixo fluxo sanguíneo no tecido adiposo (22). Apesar disso, o nosso grupo e outros demonstraram hipoxia no tecido adiposo de modelos de obesidade (23). Também não obtivemos diferenças na expressão do PGC1 α entre os diferentes grupos, o que pode estar relacionado com a temperatura constante (22°-24°) a que o nosso estudo foi efetuado.

O factor de transcrição PPAR γ , como já foi abordado anteriormente, é um importante marcador da diferenciação e da função do TA, controlando os níveis de adiponectina. Estudos anteriores efetuados no nosso laboratório demonstraram não haver alterações da sua expressão no TA, após administração de MG. O PPAR γ induz a expressão do C/EBP e atua coordenadamente para regular a conversão de adipócitos imaturos em adipócitos maduros (9). Tal como o PPAR γ , o C/EBP não mostrou nenhuma alteração da sua expressão nos diferentes grupos, em comparação com o grupo Ct.

A disfunção microvascular é potenciada pela via dos AGEs, nomeadamente, pela importante acção do metilglioxal que afeta de forma significativa a resposta angiogénica (15). Na obesidade hipertrófica, o volume do adipócito é superior à distância máxima de difusão do oxigénio, verificando-se, assim, uma deficiente difusão do oxigénio que pode conduzir a disfunção do tecido adiposo, se a angiogénese e a vascularização estiverem também comprometidas. Na obesidade ocorrem alterações funcionais e estruturais das arteríolas do tecido adiposo subcutâneo, que se agravam na presença de DM2 (16). Mostrámos anteriormente que, em condições de diminuição da irrigação no tecido adiposo, a acumulação de AGEs mostrou-se prejudicial ao correto metabolismo do adipócito com repercussões a nível sistémico. A progressiva acumulação de AGEs durante a expansão do tecido adiposo, contribuiu para a disfunção vascular local levando a hipoxia e resistência à insulina(18). Dados mais recentes, utilizando o mesmo modelo animal, demonstraram que a irrigação do tecido adiposo epididimal e subcutâneo do grupo HFDMG encontra-se comprometida, com aumento da hipoxia e diminuição da activação da via do receptor da insulina. A maioria das ações conhecidas da AngII são desencadeadas pela ligação ao seu receptor de membrana AT1. A AngII é capaz de aumentar as espécies reactivas de oxigénio por via da NADPH, induzindo a expressão de MCP-1 e, conseqüentemente, a activação de vias redox pró-inflamatórias, como o factor de transcrição NF-kB, e ainda inibir a diferenciação do adipócito. O MCP-1 é uma adipocina capaz de induzir uma resposta inflamatória que pode contribuir, em parte, para a insulino-resistência e a síndrome metabólica(24).

No presente estudo, no grupo MG, verificámos um aumento, embora não significativo, da expressão do receptor AT1, enquanto no grupo HFD verifica-se uma diminuição da sua expressão, relativamente ao grupo MG, o que é aparentemente revertido no grupo com dieta gorda e MG (HFDMG). Estes resultados sugerem que o

tecido adiposo dos ratos submetidos à dieta gorda tem capacidade de irrigação apresentando como mecanismo de defesa, uma diminuição do receptor AT1, o que não se verifica na presença da glicação

A produção de AGt tem tendência a estar aumentada na obesidade, o que não foi observado no nosso estudo. De facto, verificámos valores tendencialmente inferiores nos grupos com dieta gorda e nos diabéticos. Este resultado não exclui a possibilidade de haver uma activação do SRA do tecido adiposo, dado que, fazem parte deste sistema vários intervenientes não avaliados neste estudo. Refira-se a renina, a enzima de conversão da angiotensina (ECA), as angiotensinas I e II e possivelmente também o receptor AT2 que é expresso nos adipócitos e actua na modulação do metabolismo lipídico. Assim, os nossos resultados sugerem que o SRA deve ser um alvo de estudo tendo em atenção os seus efeitos vasoactivos locais e as repercussões sistémicas.

CONCLUSÃO

Durante a última década surgiram grandes avanços no esclarecimento do papel do tecido adiposo na obesidade, na síndrome metabólica e na diabetes. No entanto, a escala assustadora da prevalência da obesidade continua a apresentar um grande desafio à comunidade. Neste contexto, com presente trabalho evidenciámos que a glicação parece comprometer a adipogénese, especificamente o processo de *browning*, contrariando a adaptação induzida pela dieta gorda. Os nossos resultados sugerem ainda que a glicação poderá afectar o SRA, comprometendo desta forma a adaptação vasoactiva que ocorre na expansão do tecido adiposo.

AGRADECIMENTOS

Desafio difícil esta página de agradecimentos, de trocar sentimentos por palavras, de agradecer a todas as pessoas que ao longo deste longo percurso ajudaram, directa ou indirectamente, a cumprir os meus objectivos.

Desta forma, deixo apenas algumas palavras, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

À minha orientadora Professora Doutora Raquel Seiça, agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em frequentar este laboratório que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica. Por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese e por permitir a minha integração na equipa desde o primeiro dia. Agradeço também a sua simpatia, disponibilidade e amizade.

Ao Doutor Paulo Matafome, expresso o meu profundo agradecimento pela coorientação, pela total disponibilidade e apoio incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos. Agradeço também a oportunidade que me deu de me integrar no Grupo de Investigação e reconheço, com gratidão, o sentido de responsabilidade que me incutiu em todas as fases deste trabalho.

Ao Doutorando Tiago Rodrigues o meu sincero obrigado pela total disponibilidade que sempre revelou comigo, pelos ensinamentos, esclarecimentos e encorajamento nos momentos de maior aflição que, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer aprender e saber mais pelas áreas de investigação.

E formalidades à parte, se me é permitido, Paulo e Tiago, obrigada pela sincera amizade, amabilidade e boa disposição em todos os momentos. O vosso apoio foi determinante na elaboração desta tese.

Aos meus colegas de Laboratório, um Muito Obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, factores muito importantes na realização desta Tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particular motivação.

Aos Meus Amigos, em especial às minhas grandes amigas de curso e certamente para a vida: Catarina Reigota, Filipa Cordeiro, Filipa Lima, pela paciência, pelos intermináveis desabafos e pela partilha dos bons momentos.

À minha Mana, Ritinha, um agradecimento especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras doces e pela transmissão de confiança e de força em todos os momentos. Por tudo, a minha enorme gratidão!

À Minha Família, em especial aos Meus Pais, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

E por fim, não posso deixar de agradecer Aos meus Avós, Avó Lina e Ernesto, que sempre me apoiaram e estiveram presentes durante todas as etapas da minha vida, sei que ficariam orgulhosos, particularmente, por presenciar esta. Estarão sempre comigo...

REFERÊNCIAS

1. Villela NR, Kramer-aguiar LG. Linked To Obesity : the Role of. 2009;(4).
2. De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*. 2008;54(6):945–55.
3. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol*. 2010;88(1):33–9.
4. Musi N, Guardado-Mendoza R. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Cell Endocrinol Heal Dis*. 2014;89(August):229–37.
5. Poher A, Altirriba J, Veyrat-durebex C, Rohner-jeanrenaud F, Poher A, Altirriba J, et al. Uncoupling protein-1 as a target for the treatment of obesity / insulin Article type: Received on: Accepted on: Frontiers website link: Citation: Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity / insulin resistance Correspondin. 2015;6(January):1–9.
6. Gustafson B, Gogg S, Hedjazifar S, Jenndahl L, Hammarstedt A, Smith U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2015 Aug 28];297(5):E999–1003. Available from: <http://ajpendo.physiology.org/content/297/5/E999>
7. Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Restricted adipogenesis in hypertrophic obesity: The role of WISP2, WNT, and BMP4. *Diabetes*. 2013;62(9):2997–3004.
8. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol* [Internet]. Elsevier GmbH.; 2013;92(6-7):229–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.06.001>
9. Ma X, Lee P, Chisholm DJ, James DE. Control of Adipocyte Differentiation in Different Fat Depots; Implications for Pathophysiology or Therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2015;6(January):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2015.00001/abstract>
10. Dani C, Billon N. Adipose Tissue Biology. *Adipose Tissue Biol* [Internet]. 2012;1–17. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4614-0965-6>
11. Seale P. Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. 2010;17–23.
12. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(1):96–105.

13. Tseng Y. Bone Morphogenetic Proteins and Adipocyte Differentiation. 2007;3(3).
14. Bagi Z, Feher A, Cassuto J. Microvascular responsiveness in obesity: Implications for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 2012;165(3):544–60.
15. Schalkwijk CG. Vascular AGE-ing by methylglyoxal: the past, the present and the future. *Diabetologia* [Internet]. 2015;1715–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-015-3597-5>
16. Matafome P, Rodrigues T, Seça R. Glycation and Hypoxia : Two Key Factors for Adipose Tissue Dysfunction. 2015;1–21.
17. Matafome P, Santos-Silva D, Crisóstomo J, Rodrigues T, Rodrigues L, Sena CM, et al. Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Arch Physiol Biochem.* 2012;118(2):58–68.
18. Rodrigues T, Matafome P, Seça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. *Arch Physiol Biochem* [Internet]. 2013;119(5):209–18. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Methylglyoxal+further+impairs+adipose+tissue+metabolism+after+partial+decrease+of+blood+supply#0>
19. Peschechera A, Eckel J. “Browning” of adipose tissue - regulation and therapeutic perspectives. *Arch Physiol Biochem* [Internet]. 2013;3455:23721302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721302>
20. Xue B, Rim J-S, Hogan JC, Coulter A a, Koza R a, Kozak LP. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res.* 2007;48(1):41–51.
21. Gamas L, Neves C, Fonseca R, Rodrigues T, Matafome P SR. Irisina e insulino-resistência em modelos animais de obesidade e diabetes tipo 2. 2015. 28 p.
22. Goossens GH, Bizzarri A, Venticlef N, Essers Y, Cleutjens JP, Konings E, et al. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation.* 2011;124(1):67–76.
23. Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes* [Internet]. 2008;33(1):54–66. Available from: <http://www.nature.com/ijo/journal/vaop/ncurrent/full/ijo2008229a.html>
24. Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirono Y, Tateno T, Sugiyama T, Hirata Y. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 expression via a nuclear factor-kappaB-dependent pathway in rat preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(4):E771–8.