

Daniela Filipa Pereira Marques

# A Bromocriptina como moduladora do metabolismo lipídico no tecido adiposo e da sensibilidade à insulina na *Diabetes Mellitus* tipo 2

Tese de Mestrado em Patologia Experimental

Maio de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Matafome e da Professora Doutora Raquel Seiça ambos, do Laboratório de Fisiologia, do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), e da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

## Agradecimentos

Esta é sem dúvida uma das páginas mais difíceis de escrever. Apesar do meu espírito alegre e brincalhão, na altura de expressar sentimentos fico um pouco aquém do que realmente sinto, e queria transmitir.

Ao meu orientador Doutor Paulo Matafome, queria tentar expressar toda a minha gratidão pelo seu total apoio e ajuda ao longo destes dois anos passados na Fisiologia. Não encontro palavras suficientes que demonstrem o quanto fui sortuda por te ter como orientador, por todos os ensinamentos, espírito de ajuda, incentivo, e confiança em mim. Obrigada por toda a paciência, por toda a amizade, força e pelos bons momentos que passámos na Fisiologia. Foi um prazer e orgulho pertencer a este grupo sob a tua orientação, quer pelo meu crescimento científico quer pessoal. Espero de alguma forma não te dececionar e um dia poder retribuir-te todo o bem que me fizeste.

À minha orientadora Professora Doutora Raquel Seiça. Prezo desde o primeiro dia a forma e o carinho com que me recebeu, e reconheço e agradeço toda a sua disponibilidade, força, e dedicação transmitido ao longo de todo o meu percurso na fisiologia.

Ao quase Doutor Tiago Rodrigues, por toda a amizade, companheirismo, encorajamento e paciência ao longo de todo este trajeto. Foste um elemento fulcral em todo o meu crescimento científico e pessoal. Obrigada por todo o apoio e conselhos.

À Doutora Liliana Letra por toda a amabilidade, carinho e tranquilidade que transmites, assim como a preocupação e encorajamento no decorrer desta jornada.

Aos restantes colegas do laboratório de fisiologia, por todo o incentivo, preocupação e crescimento pessoal. Em especial à Margarida Geraldo, por me ouvires nos momentos menos bons e por toda a força que me transmitiste; e à Diana Ribeiro que mesmo longe esteve e está sempre presente quer nos bons ou maus momentos. Obrigada amiga.

Às minhas meninas da RAJA, Mariana Queirós, Adriana Pinho e Margarida Henriques por toda a preocupação, por todos os miminhos e amizade ao longo destes dois anos. Têm um lugar especial no meu coração.

Às amigas que Évora me deu, um especial agradecimento à Ana Hipólito, Cláudia Marques, Filipa Robalo e Rita Fialho, por todos os bons momentos passados, por me ouvirem quando mais precisei e por estarem sempre lá.

Às minhas amigas de Alcochete, por todo o companheirismo, amizade e por continuarem a ter um papel ativo em mais uma etapa da minha vida. Um especial agradecimento à Inês Machado pela partilha da “dor” na escrita da tese, pelas noites mal dormidas e pelos telefonemas.

Por fim mas não menos importante, aos meus pais, irmão, avós, tios e primos, que mesmo não sabendo muito bem o faço existe sempre uma palavra amiga e uma especial preocupação. Em especial aos meus pais, pois sem vocês nada disto teria sido possível. E à minha mãe por acreditar sempre em mim, por me incentivar sempre no meu crescimento e querer sempre o meu bem.

A todos, o meu mais sincero agradecimento!

# Índice Geral

Lista de Figuras .....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Resumo .....	xiii
Abstract.....	xv
Capítulo I: Introdução.....	1
1. Considerações Gerais - Diabetes Mellitus tipo 2.....	2
2. Tecido Adiposo .....	3
2.1.Funções do Tecido Adiposo.....	3
2.2.Insulino-resistência .....	5
2.3.Disfunção do Tecido Adiposo.....	6
3. Catecolaminas.....	7
3.1.Via de Síntese .....	9
3.2.Dopamina .....	11
4. Metabolismo dos Lípidos .....	13
5. Bromocriptina.....	19
Capítulo II: Objetivos.....	22
Capítulo III: Material e Métodos.....	24
1. Material e Métodos.....	25
1.1.Reagentes Utilizados .....	25
1.2.Modelos Animais.....	25
1.3.Estudos <i>in vivo</i> .....	26
1.3.1.Tratamento com Bromocriptina .....	26
1.3.2.Monitorização do Peso e Ração.....	27
1.3.3.Parâmetros Sistêmicos.....	27

1.4. Estudos <i>in vitro</i> .....	28
1.4.1. Determinação dos Níveis de Proteína no TAE - <i>Western Blotting</i> .....	28
2. Análise Estatística .....	30
Capítulo IV: Resultados .....	31
1. Monitorização do Peso e Ração .....	32
2. Avaliação dos Parâmetros Sistêmicos .....	33
2.1. Tolerância à Glicose e Sensibilidade à Insulina .....	33
2.2. Insulinemia, Glucagina e HOMA .....	35
2.3. Perfil Lipídico .....	36
3. Detecção de Proteínas <i>in vitro</i> por <i>Western Blotting</i> .....	37
3.1. Recetores Dopaminérgicos, Adrenérgicos e Enzimas Envolvidas .....	37
3.2. Marcadores de Insulino-resistência .....	39
3.3. Marcadores Envolvidos na Oxidação Lipídica .....	41
3.4. Marcadores Relacionados com o Armazenamento e Formação de Ácidos Gordos. .	42
Capítulo V: Discussão .....	44
Capítulo VI: Conclusões .....	50
Capítulo VII: Referências Bibliográficas .....	52

## Lista de Figuras

Figura 1: Fisiologia da neurotransmissão dopaminérgica, retirado de (Golan et al., 2009) ... **Erro!**

**Marcador não definido.**

Figura 2: Vias de produção da dopamina no cérebro, adaptado de (Rang et al., 2012) ..... 12

Figura 3: Via de sinalização do recetor de insulina, adaptado de (Nash, 2016). ..... 14

Figura 4: Via de regulação da DARPP-32, adaptado de (Nash, 2016). ..... 17

Figura 5: Mecanismos de regulação da lipólise e da lipogénese do tecido adiposo ..... 18

Figura 6: Esquema ilustrativo dos grupos experimentais e do tratamento com Bromocriptina 26

Figura 7: Área debaixo da curva (AUC) na prova de tolerância à insulina (A), glicemia às duas horas na mesma prova (A), e valores da glicemia após 6 horas de jejum (B)..... 34

Figura 8: Níveis de Insulinemia (A), glucagina (B) e HOMA (C). ..... 35

Figura 9: Níveis séricos (A) de Triglicérideos e Colesterol total (B)..... 36

Figura 10: Análise por *Western Blotting* dos níveis do recetor D1 (A) e D2 (B), do recetor adrenérgico  $\beta$ 3 (C) e da enzima TH (D). ..... 38

Figura 11: Análise por *Western Blotting* do recetor da insulina na sua forma total (IR-T) (A) e fosforilada (IR-P) (B), e do transportador de glucose (GLUT4) (C). ..... 40

Figura 12: Análise por *Western Blotting* da AMPK na forma total (A) e na forma fosforilada (B) ..... 41

Figura 13: Análise por *Western Blotting* das proteínas HSL na forma total (A), e fosforilada (B) e da Perilipina A (C) ..... 42

Figura 14: Análise por *Western Blotting* das proteínas ACC na forma total (A) e fosforilada (B) e da FAS (C) ..... 43

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Soluções utilizadas na técnica de Western <i>Blotting</i> .....	30
Tabela 2: Representação esquemática da ração ingerida no último mês (g) ingestão calórica para esse período (Kcal), peso corporal no dia do sacrifício (g), e peso do TAE (g) para os diferentes grupos de estudo. ....	33



**Lista de abreviaturas**

AADC	L-aminoácido aromático descarboxilase
AC	Adenil ciclase
Ac	núcleo accumbens
ACC	Acetil-coenzima A carboxilase
Acetil-CoA	acetilcoenzima A
ADP	adenosina difosfato
Am	amígdala
AMPK	5' adenosina monofosfato ativado proteína quinase
ATGL	<i>triglyceride lipase</i>
ATP	adenosina trifosfato
AUC	área debaixo da curva
$\beta$ -AR	recetor adrenérgico $\beta$
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	cerebelo
$\text{Ca}^{2+}$	ião cálcio
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
D2L	recetor dopamina cadeia longa
D2S	recetor dopamina cadeia curta
DA	dopamina
DARPP-32	fosfoproteína regulada por dopamina e cAMP
DAT	transportador de dopamina
DBH	dopamina $\beta$ -hidroxilase
DMSO	dimetilsulfóxido
DMTII	diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético

E	epinefrina
ERK	cinase regulada por sinais extracelulares
FAS	<i>Fatty acid sintetase</i>
FDA	Food and Drug Administration
FELASA	Federação Europeia das Associações Científicas e de Experimentação Animal
FFA	ácidos gordos livres
GLUT4	transportador de glicose tipo 4
Grb2	recetor do fator de crescimento 2
GSK3 $\beta$	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
H <sup>+</sup>	ião hidrogénio
HbA1c	hemoglobina glicada A1C
Hip	hipocampo
HOMA	<i>homeostatic model assessment</i>
HSL	lipase hormono-sensitiva
Hyp	hipotálamo
i.p	intraperitoneal
IL	interleucina
IR	recetor da insulina
IRS	substrato do recetor da insulina
L-Dopa	1-3,4-diidroxifenilalanina
LPL	lipoproteína lipase
M1	macrófagos pró-inflamatórios
M2	macrófagos anti-inflamatórios
Malonil-CoA	malonilcoenzima A
MAO	monoamina oxidase
MAPKs	MAP cinases

Na <sup>+</sup>	ião sódio
NE	norepinefrina
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
P	glândula pituitária
PDE-3B	fosfodiesterase-3-β
PDK1	<i>phosphoinositide-depend kinase</i>
PerA	perilipina A
PGC1α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PI3K	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase
PKA	proteína cinase A
PKB/AKT	proteína cinase B
PNMT	<i>phenylethanolamine N-methyltransferase</i>
PP1	proteína fosfatase 1
PPARγ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTI	prova de tolerância à insulina
PVDF	<i>polyvinylidene fluoride</i>
Ras	GTPase
Sep	Septo
SN	<i>substância nigra</i>
SNC	sistema nervoso central
Str	corpo estriado
TAE	tecido adiposo epididimal
TH	tirosina hidroxilase
TNF-α	fator de necrose tumoral
UCP-1	<i>uncoupling protein-1</i>
VLDL	proteínas de muito baixa densidade

VMAT	transportador de monoaminas vesicular
VMH	hipotálamo ventromedial
VTA	área tegumentar ventral
WAT	tecido adiposo branco

## Resumo

**Introdução e Objetivos:** A obesidade está associada ao desenvolvimento de insulino-resistência e disfunção do tecido adiposo, conduzindo a alterações do metabolismo lipídico e glicêmico, e em última instância, diabetes tipo 2 (DMT2). A bromocriptina, um agonista dopaminérgico D2, mostrou-se promissora no tratamento da DMT2 contribuindo para a diminuição dos níveis da glicemia. No entanto, os mecanismos de ação da bromocriptina bem como a sua ação nos tecidos sensíveis à insulina não são conhecidos. Neste estudo tivemos como objetivo avaliar o potencial terapêutico da bromocriptina na modulação da sensibilidade à insulina em ratos diabéticos tipo 2 com obesidade induzida pela dieta, bem como a sua ação no tecido adiposo periepídimal (TAE).

**Métodos:** Foram utilizados ratos *Wistar* (W) alimentados com dieta normal (grupo 1) e ratos *Goto-Kakizaki* (GK) diabéticos tipo 2 não obesos divididos em 4 grupos: GK com dieta normal (grupo 2), GK com obesidade induzida por uma dieta rica em gordura e sacarose (grupo 3 - GKHFD), GKHFD tratados com bromocriptina (10mg/Kg/dia) durante 30 dias (grupo 4 - GKHFDBr) e GKHFD tratados com veículo (grupo 5 - GKHFVh) (n=8/grupo). Além da avaliação do perfil glicêmico e lipídico, foi avaliada a tolerância à insulina (prova de tolerância à insulina), bem como os mecanismos associados à captação e utilização da glicose e dos ácidos gordos no TAE.

**Resultados:** Os ratos GK obesos apresentaram um agravamento da tolerância à insulina e dos níveis em jejum da glicemia, colesterol e dos triglicerídeos, em relação aos seus controles não obesos. O tratamento com bromocriptina reduziu a intolerância à insulina, e a glicemia em jejum. No TAE, aumentou os níveis do transportador da glicose GLUT4, a expressão dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, e de marcadores relacionados com a oxidação lipídica.

**Conclusões:** Embora os mecanismos subjacentes sejam ainda desconhecidos, estes resultados sugerem que a bromocriptina melhora o perfil glicêmico e a resistência à insulina na DMT2,

aumentando a sinalização dopaminérgica no tecido adiposo e alterando o metabolismo dos ácidos gordos. Estudos futuros permitirão desvendar os mecanismos envolvidos.

Palavras Chave: diabetes *mellitus* tipo 2, obesidade, dopamina, bromocriptina, e tecido adiposo.

## Abstract

**Introduction and objectives:** Obesity is associated with the development of insulin resistance and dysfunction of adipose tissue, leading to changes in lipid and glycemic metabolism, and ultimately type 2 diabetes (DMT2). Bromocriptine, a D2 dopaminergic agonist, has been shown to be promising in the treatment of DMTII contributing to the reduction of glycemic levels. However, the mechanisms involved as well as its action on insulin sensitive tissues are not known. Thus, our goal was to evaluate the therapeutic potential of bromocriptine in the modulation of peripheral sensitivity to insulin in an obese type 2 diabetic animal model, as well as insulin signaling in epididymal adipose tissue (TAE).

**Methods:** *Wistar* (W) rats fed with normal diet (group 1) and non-obese type 2 diabetes, *Goto-Kakizaki* (GK) were divided into 4 groups: GK with normal diet (group 2), GK with diet-induced obesity (group 3 - GKHFD), GKHFD treated with bromocriptine (10mg / kg / day) for 30 days (group 4 - GKHFDBr) and GKHFD treated with vehicle (group 5 - GKHFVh) (n = 8 / group). In addition to the evaluation of the glycemic and lipid profile and insulin tolerance, the mechanisms of glucose and fatty acids uptake and oxidation were evaluated in the TAE.

**Results:** Obese GK rats had lower insulin tolerance and increased fasting levels of glucose, cholesterol and triglycerides in relation to their non-obese controls. The treatment with bromocriptine reduced insulin intolerance and fasting glycemia. In adipose tissue, the expression of GLUT4, D1 and D2 receptors, as well as markers related to lipid oxidation were also improved.

**Conclusions:** Although the underlying mechanisms are still unknown, these results suggest that bromocriptine improves the glycemic profile and insulin resistance in DMT2 by increasing dopaminergic signaling in adipose tissue. Future studies will disclose the mechanisms involved.

**Keywords:** diabetes mellitus type II, obesity, dopamine, bromocriptine, and adipose tissue.

## Capítulo I: Introdução



## 1. Considerações Gerais - Diabetes Mellitus tipo 2

A diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade, devido ao seu carácter progressivo multifatorial, afetando cerca de 422 milhões de pessoas. (Nègre-salvayre et al., 2009). A prevalência desta patologia a nível mundial tem aumentado significativamente, uma vez que em 2007 estimou-se que 246 milhões de adultos tivessem diabetes, e projeta-se que no ano de 2025 esse número exceda os 380 milhões, equivalendo a 6% da população adulta (Chambel et al., 2011; Uva, Victorino, Roquette, Machado, & Dias, 2015). No entanto existem regiões como o médio oriente, em que poderá atingir valores na ordem dos 10%, assim como Portugal, em que 900 mil indivíduos estão afetados por este distúrbio (Stefánsson & Einarsdóttir, 2015).

A DMT2 caracteriza-se por uma deficiência ou resistência à insulina (IR), com episódios de hiperglicemia sanguínea e intolerância à glicose, que conseqüentemente poderá levar a complicações micro e macrovasculares graves, assim como distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos (Bastaki, 2005; Hirata & Hirata, 2006; Piero, Nzaro, & Njagi, 2015). São vários os fatores que poderão estar na origem desta patologia, desde a interação entre fatores genéticos, ambientais (obesidade) ou até mesmo complicações hepáticas, musculares e do tecido adiposo (Shah & Brownlee, 2016; Tahrani, Bailey, Del Prato, & Barnett, 2011). Este perfil é designado por não insulino-dependente e corresponde à forma mais predominante desta doença, sendo responsável por 90% dos casos de diabetes *mellitus* (Ozougwu, Obimba, Belonwu, & Unakalamba, 2013). A longo prazo é responsável pelo desenvolvimento de hipertensão, dislipidémia e disfunção endotelial, o que contribui para o risco e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Lamos, Levitt, & Munir, 2016). Durante muitos anos, pouco foi alterado na prescrição de fármacos de controlo da glicose, continuando a ser estabelecido o uso da metformina e das sulfonilureias após o controlo do peso e da dieta nos pacientes com diabetes tipo 2 (Lamos et al., 2016). Assim, é urgente a identificação de

novos alvos terapêuticos capazes de vir a ter um papel preponderante no controlo da DMT2 e que será debatido mais adiante.

## 2. Tecido Adiposo

Nas últimas décadas o consumo exagerado de gorduras e açúcar tem potenciado o desenvolvimento à escala global da obesidade, de tal forma que a nível mundial um em cada dez adultos é considerado obeso (Wharton, 2015). Esta síndrome metabólica, caracterizada pelo desenvolvimento de insulino-resistência, afeta cerca de 25-31% de indivíduos na Europa, com tendência a crescer devido ao progressivo número de crianças e adolescentes. Esta propensão para a obesidade irá conduzir ao gradual número de doenças cardiovasculares, como hipertensão, diabetes e cancro (P Matafome, Santos-Silva, Sena, & Seiça, 2013; Raajendiran, Tsiloulis, & Watt, 2016).

Nos últimos anos tem sido descoberto a secreção de uma imensa gama de proteínas pelo tecido adiposo, o que é possível ditar que foi descoberto um novo conceito sobre a função biológica deste tecido, não apenas como fornecimento e armazenador de energia, mas também como um órgão endócrino envolvido numa variedade de processos metabólicos e fisiológicos. (Tiago Rodrigues, Matafome, & Seiça, 2013)

### 2.1. Funções do Tecido Adiposo

O tecido adiposo branco (WAT) é responsável pelo armazenamento de energia na forma de lípidos, regulando a sua distribuição pelo corpo, assim como, a homeostasia da glicose a nível sistémico. É composto por adipócitos, responsáveis pela acumulação de gordura na forma de triglicéridos e regulação da temperatura, pré adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos. Os triglicéridos são maioritariamente captados na forma de quilomícrons e proteínas de muito baixa densidade (VLDL). Estas lipoproteínas não conseguem penetrar a

parede dos capilares, sendo hidrolisadas pela lipoproteína lipase (LPL). Após a ação da LPL ocorre a liberação de ácidos gordos não esterificados a partir dos triglicerídeos, sendo armazenados na gota lipídica do adipócito (Lafontan & Langin, 2009).

As células do tecido adiposo produzem uma vasta gama de hormonas, fatores de crescimento e citocinas denominadas por adipocinas (Emanuel et al., 2017; P Matafome et al., 2013; Muoio & Newgard, 2008). Estas adipocinas incluem a leptina, adiponectina, resistina, visfatina, entre outras, e têm funções parácrinas, autócrinas ou endócrinas a múltiplos níveis, incluindo a regulação do dispêndio energético. Na obesidade, o seu perfil secretor altera-se, conduzindo a uma menor capacidade de oxidação dos lípidos. Além disso, a capacidade do tecido adiposo periepidual (TAE) em armazenar lípidos nas gotas lipídicas pode ficar comprometida, fazendo aumentar os níveis de ácidos gordos livres (FFA) em circulação e resultando na redistribuição anormal de lípidos por outros órgãos e tecidos (Emanuel et al., 2017; Luo & Liu, 2016; P Matafome et al., 2013; Muoio & Newgard, 2008).

No caso do tecido adiposo castanho, este apresenta diferentes funções do branco, pela sua capacidade em dissipar a energia química por meio de calor, através das abundantes mitocôndrias e dos elevados níveis da *uncoupling protein-1* (UCP1). Desta forma, a sua função foi eminentemente associada à adaptação ao frio pela hidrólise de triglicerídeos e pela oxidação de ácidos gordos. (Guilherme, Virbasius, Vishwajeet, & Czech, 2008; Luo & Liu, 2016; Ravnskjaer, Madiraju, & Montminy, 2015). (Bostrom et al., 2012) mostraram ainda que existe outro tipo de tecido adiposo, denominado bege, alcançado por ação do “browning” do tecido adiposo branco, através da sobre expressão da UCP1, por ação do frio, ou por estimulação de agonistas dos recetores  $\beta$  adrenérgicos. Para além da UCP-1, a ativação do *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR $\gamma$ ) e do seu coativador (PGC1 $\alpha$ ) podem levar à sobre expressão de genes envolvidos na génese da mitocôndria, nomeadamente na termogénese (Luo & Liu, 2016)

Desta forma, é possível que, tanto o tecido adiposo castanho, como o bege, através da sobre expressão destas proteínas, sejam uma nova maneira de combater a obesidade e os distúrbios metabólicos, por aumento do dispêndio energético (Luo & Liu, 2016).

## 2.2. Insulino-resistência

Num estado pós-prandial a normalização dos níveis sanguíneos de glicose é atingido pela secreção de insulina a partir do pâncreas, sendo favorecida a glicogénese e a lipogénese (Boyda, Procyshyn, Pang, & Barr, 2013). Uma das funções da insulina após a entrada de glucose nas células é estimular o catabolismo desta em piruvato através da glicólise, acumulando o seu excesso através da glicogénese, bem como o armazenamento de acetilcoenzima A (Acetil-CoA) através da lipogénese (Piero et al., 2015). Em jejum, pelo contrário, a libertação de glucagina é responsável pela decomposição do glicogénio em glucose através da glicogenólise hepática (Boyda et al., 2013).

O excesso de peso e a obesidade são uma das maiores contribuições para o desenvolvimento da insulino-resistência periférica e hepática. Em condições normais, a célula  $\beta$  pancreática tem a capacidade de aumentar a produção de insulina, de modo a assegurar os valores basais da glicemia (Emanuel et al., 2017). Quando alterada, a tolerância à glucose fica comprometida levando ao desenvolvimento de hiperinsulinemia e, aquando da falência da célula  $\beta$ , diabetes *mellitus* tipo 2 (Saini, 2010; Tahrani et al., 2011).

Apesar de ainda não serem conhecidos os mecanismos envolvidos na resistência à insulina, têm sido apontadas algumas hipóteses, nomeadamente o aumento da produção de ácidos gordos. A acumulação de ácidos gordos no interior do adipócito leva à ativação de vias inflamatórias como por exemplo o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), que favorece a fosforilação inibitória do substrato do recetor da insulina provocando insulino-resistência (Nash, 2016). Neste contexto, a perda da ação da insulina favorece aceleração da produção de

glicose hepática (gluconeogénese), o aumento da hidrólise dos triglicéridos (lipólise), com aumento dos níveis plasmáticos de FFA (DeFronzo, 2011).

### 2.3. Disfunção do Tecido Adiposo

Em resposta ao aumento do fluxo nutricional (aumento do volume de tecido adiposo visceral), os adipócitos acumulam lípidos em gotículas lipídicas, na forma de triglicéridos. Aquando da hipertrofia do adipócito, pode ocorrer um processo de desregulação metabólica, como lipólise, resultando na acumulação da gordura em excesso noutros tecidos, tais como o fígado e o músculo esquelético (T Rodrigues, Matafome, & Seiça, 2013). O desenvolvimento de insulino-resistência na obesidade associa-se à desregulação de vias celulares de armazenamento lipídico, o que contribui para a disfunção do tecido adiposo. O PPAR é expresso nos adipócitos e nos macrófagos, com funções no armazenamento lipídico. Em condições fisiológicas, esta proteína aumenta a expressão de proteínas envolvidas na captação e armazenamento de ácidos gordos, ou seja, quando ativado promove a sensibilidade à insulina, reduzindo os ácidos gordos livres no citoplasma. Contudo, na obesidade ocorre o aumento de FFA e dos seus derivados como o acetil-CoA, que levará a um comprometimento da oxidação e posteriormente acumulação destes produtos na célula, devido à capacidade limitada de metabolização da mitocôndria (Paulo Matafome, Rodrigues, & Seiça, 2015).

Além desta função, é ainda conhecido que o PPAR $\gamma$  inibe diretamente fatores de transcrição como o *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), comprometendo desta forma a expressão de citocinas e de outros mediadores inflamatórios conhecidos por inibirem a adipogénese e levarem ao crescimento dos adipócitos já existentes, levando à sua hipertrofia. Nesta situação, a normal sinalização da insulina irá estar comprometida devido à fosforilação inibitória do substrato do recetor, impedido, desta forma, que a glicose entre na célula. Consequentemente, a deposição ectópica de ácidos gordos noutros tecidos, como o músculo e

o fígado, conduz à lipotoxicidade, o que leva à evolução para resistência à insulina e em última instância diabetes tipo 2 (Luo & Liu, 2016; P Matafome et al., 2013; Morigny, Houssier, Mouisel, & Langin, 2015). Vários estudos demonstram o papel benéfico da 5'-adenosina monofosfato ativado proteína cinase (AMPK) nestes processos, por parecer estar envolvida na regulação do balanço energético e, em particular, na promoção do dispêndio energético. Este fato está também associado à sua capacidade de inibir a síntese de citocinas pró-inflamatórias nos macrófagos e adipócitos, incluindo o TNF- $\alpha$  e a interleucina (IL)-1 $\beta$  e a IL-6, bem como o aumento da expressão de citoquinas anti-inflamatórias como a IL-10 nos macrófagos (Bijland, Mancini, & Salt, 2013).

Em consequência da expansão exagerada do tecido adiposo na obesidade, este poderá formar zonas hipóxicas por falta de suprimento de oxigênio, o que levará ao recrutamento de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, causando insulino-resistência e recrutamento de células inflamatórias (Paulo Matafome et al., 2015). Estas quimiocinas recrutam células do sistema imunitário como os macrófagos, que poderão estar alterados de anti-inflamatórios (M2) para pró-inflamatórios (M1), apesar do seu papel ainda não ser completamente conhecido (Morigny et al., 2015). O aumento da oxidação de ácidos gordos tem vindo a ser apontada como uma estratégia para a diminuição da inflamação e, assim, da resistência à insulina (Lafontan & Langin, 2009).

### 3. Catecolaminas

As catecolaminas constituem uma categoria de hormonas e neurotransmissores responsáveis por diversas funções no corpo humano, intervindo na regulação de diversos processos fisiológicos mas também nas doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes tipo 2 (Eisenhofer, Kopin, & Goldstein, 2004). Estas hormonas incluem a dopamina (DA) a norepinefrina (NE) e a epinefrina (E), que mostraram recentemente a sua importância no WAT,

por estarem implicadas na regulação da lipólise por estimulação de recetores adrenérgicos (Bartness, Shrestha, Vaughan, Schwartz, & Song, 2010; Eisenhofer et al., 2004).

As catecolaminas são sintetizadas maioritariamente nas células cromafins da medula adrenal, e nas células neuronais, mas também nas células imunes B e T e nos macrófagos. As quatro enzimas responsáveis pela síntese de catecolaminas incluem a tirosina hidroxilase (TH), a L-aminoácido aromático descarboxilase/dopa descarboxilase (AADC), a dopamina  $\beta$ -hidroxilase (DBH) e a *phenylethanolamine N-methyltransferase* (PNMT), segundo a via de síntese descrita na (secção 3.1) (Vargovic et al., 2011). Demonstrou-se recentemente, através da administração *in vitro* de um inibidor da TH a adipócitos do mesentérico de rato, que existe a síntese de catecolaminas endógena por parte do tecido adiposo (Vargovic et al., 2011).

As catecolaminas atuam nos tecidos através de recetores seletivos para a norepinefrina e epinefrina, sendo no entanto possível verificar a ligação de dopamina quando em concentrações suprafisiológicas. Estes recetores estão divididos em classes  $\alpha$  e  $\beta$  de acordo com o tecido aonde atua, sendo a subclasse  $\beta_3$  a mais abundante no tecido adiposo branco e castanho em roedores (Boyda et al., 2013). Em humanos, os recetores adrenérgicos  $\beta_3$  são os responsáveis pela ativação das vias lipolíticas, sendo o contrário verificado para os  $\alpha_2$ , que faz a função oposta, inibindo o sinal de lipólise (Bartness et al., 2010; Morigny et al., 2015). Os recetores  $\beta_3$  atuam diretamente no aumento da adenosina monofosfato cíclico (cAMP), ativando os recetores acoplados à proteína G, a adenil ciclase (AC) e a proteína cinase A (PKA). (Bartness et al., 2010)

Estudos efetuados em ratinhos normais e obesos demonstraram que o uso de um agonista do  $\beta_3$ , o SR-58611A, melhorou a tolerância à glicose especialmente após a administração crónica. Outros estudos mostraram os mecanismos envolvidos no agonismo dos retores  $\beta_3$ , tendo sido verificado uma diminuição da produção hepática de glucose, aumento da expressão do GLUT1/4 e um aumento da captação lipídica independente da insulina no músculo esquelético. Apesar de este recetor provocar estes efeitos no tecido adiposo e no músculo

esquelético, a sua excessiva estimulação nas células cromafins humanas pode levar ao excesso de produção de E e NE, o que pode comprometer o metabolismo da glicose (Boyda et al., 2013).

Outros estudos mostraram efeitos benéficos da inativação dos três recetores adrenérgicos na proteção contra à obesidade induzida pela dieta (Lafontan & Langin, 2009).

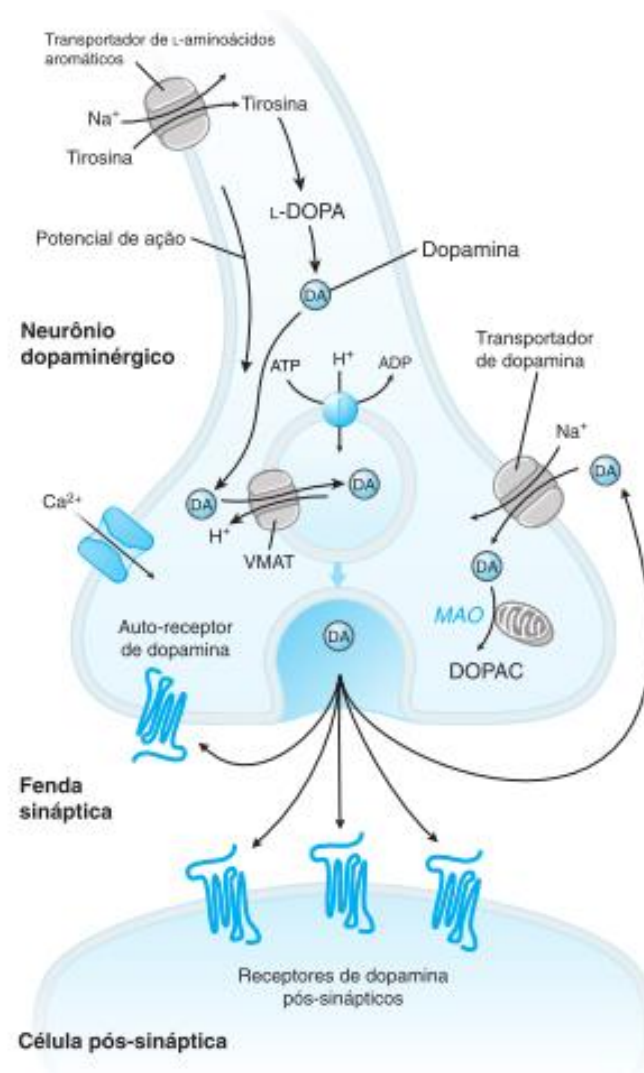
### 3.1. Via de Síntese

A síntese de catecolaminas parte do aminoácido tirosina, obtido principalmente pela dieta, mas também em menores proporções pela síntese no fígado a partir da fenilalanina (Golan, Junior, Armstrong, & Armstrong, 2009). A tirosina, por ação da enzima TH, uma ferro-enzima, é convertido em 1-3,4-diidroxifenilalanina (L-Dopa), e esta última em dopamina por ação da enzima AADC (Golan et al., 2009; Vargovic et al., 2011). É conhecido que a oxidação da tirosina em L-Dopa é a reação que catalisa a velocidade da produção de todas as catecolaminas (Golan et al., 2009). Esta via finda por aqui quando se trata dos neurónios dopaminérgicos. No caso dos adrenérgicos, a via prossegue e a dopamina é convertida em noradrenalina pela enzima  $\beta$ -hidroxilase e posteriormente em adrenalina/epinefrina pela enzima PNMT (Estevinho & Fortunato, 2003).

A dopamina produzida no citoplasma dos neurónios é transportada em vesículas sinápticas que posteriormente poderão ser utilizadas para reserva ou para libertação. O armazenamento da dopamina em vesículas está intimamente relacionado com a capacidade de proteínas presentes na membrana da vesícula, que têm como função a captação e armazenamento de dopamina. Deste modo, existem dois transportadores com essas funções, uma ATPase que tem a capacidade de criar um gradiente eletroquímico de  $H^+$  e o transportador de monoaminas vesicular (VMAT) que tira partido desse gradiente, deslocando os prótons para fora da vesícula, e transportando a dopamina para dentro dela. Posto isto, e após a estimulação



nervosa, estas vesículas alcançam a fusão com a membrana plasmática, libertando dopamina na fenda sináptica. Uma vez no espaço sináptico, ela poderá ter dois propósitos: ou é captada pelos recetores da membrana pós-sináptica, ou é reabsorvida pela célula pré-sináptica por proteínas como o transportador de dopamina (DAT). A dopamina recuperada pode ser utilizada novamente pelo VMAT, ou podem ser degradadas pela ação de enzimas como a monoamina oxidase (MAO). A MAO é uma enzima mitocondrial que tem diferentes isoformas, ambas com especificidade para a dopamina, no entanto a MAO-B apresenta uma ação maior, degradando a dopamina mais rapidamente (figura 1) (Estevinho & Fortunato, 2003; Golan et al., 2009).



**Figura 1: Fisiologia da neurotransmissão dopaminérgica, retirado de (Golan et al., 2009)**

ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato;  $\text{Ca}^{2+}$ , íon cálcio; DA, dopamina; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético;  $\text{H}^{+}$ , íon hidrogénio; L-DOPA- 1-3,4-dihidroxifenilalanina, MAO- monoamina oxidase;  $\text{Na}^{+}$ , íon sódio; VMAT- transportador de monoaminas vesicular.

### 3.2. Dopamina

O hipotálamo e o núcleo supraquiasmático são os responsáveis pelos ritmos circadianos e estão frequentemente associados a muitas funções a eles associadas como por exemplo a alimentação, sincronizando o metabolismo da glicose. A dopamina regula os ritmos circadianos de forma a modular a função do sistema autónomo e neuroendócrino, afetando o armazenamento de gorduras, a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose. Desta forma é possível identificar que os ritmos circadianos têm um papel preponderantes na resistência à insulina e ao desenvolvimento da diabetes tipo 2 (Schwartz & Zangeneh, 2016).

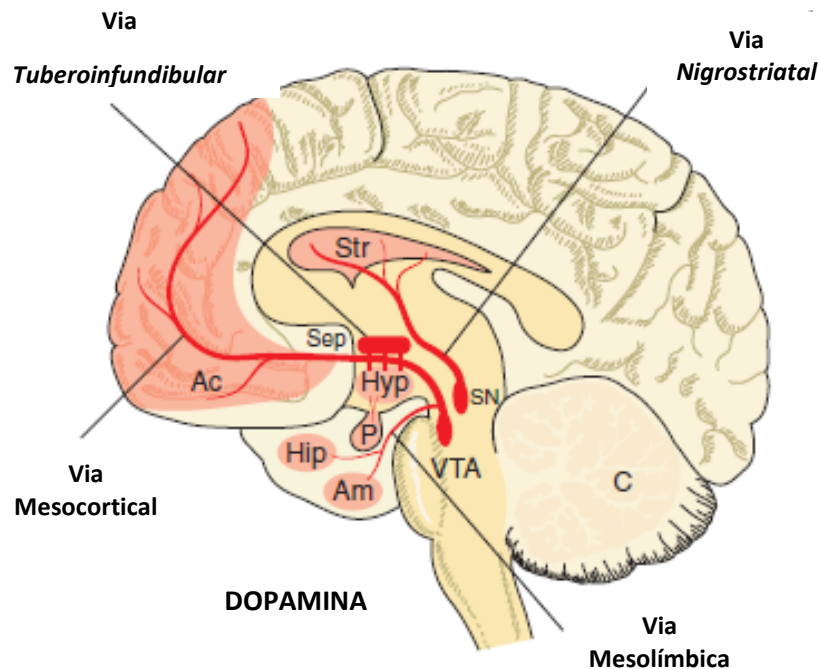
A dopamina é um neurotransmissor que tem sido alvo de estudo por estar associado ao “*wanting*”, aumento da motivação devido ao sistema de recompensa (Ribeiro & Santos, 2013). Esta catecolamina desencadeada devido a estímulos provenientes de drogas ou de alimentos, além do papel na motivação, regula outras funções fisiológicas do corpo humano, tais como: coordenação motora, locomoção, cognição, comportamento alimentar, homeostasia energética, memória, humor, aprendizagem e secreção hormonal. Contudo, a nível periférico sabe-se que desempenha um importante papel na regulação do olfacto, processos na retina, regulação hormonal, funções cardiovasculares, regulação simpática, sistema imune, funções renais, entre outras (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

A dopamina é originada através de quatro vias de produção a nível cerebral, (figura 2):

- A via *Nigroestriatal*, reponsável por 75% da dopamina produzida a nível central. Estes nervos situam-se no feixo mediano do proencéfalo, com proveniência da *substância nigra* e terminando no estriado;
- As vias mesocorticais, que se encontram desde a área tegumentar através do proencéfalo e até ao lobo frontal do córtex pré-frontal;
- As vias mesolímbicas, de vão desde a área tegumentar ventral até ao sistema límbico, mais propriamente o núcleo accumben;

- A via tuberoinfundibular, que vai desde o hipotálamo até à hipófise.

(Lopez Vicchi et al., 2016; Rang, Dale, Ritter, Flower, & Henderson, 2012).



**Figura 2: Vias de produção da dopamina no cérebro, adaptado de (Rang et al., 2012)**

Ac, núcleo Accumbens; Am, amígdala; C, cerebelo; Hip, hipocampo; Hyp, hipotálamo P, glândula pituitária; Sep, septo; SN, *Substância nigra*; Str, corpo estriado; VTA, Área tegumentar ventral.

Sabe-se que a dopamina possui diferentes recetores, que apesar de partilharem vários domínios transmembranares, têm diferentes propriedades farmacológicas e bioquímicas. Desta forma os recetores foram divididos consoante a sua capacidade para modular o cAMP; o grupo D1 engloba as isoformas D1 e D5, que acopladas à proteína Gs estimulam a AC; e o grupo D2 (D2, D3 e D4), que acopladas às proteínas Gi/G0 inibem a AC (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Os recetores D1 e D2 podem ser encontrados em diversas regiões, sendo a concentração de D1 predominante no estriado, hipocampo e hipotálamo e de D2 nos gânglios da base, no tubérculo olfatório, na glândula pituitária e células  $\beta$  pancreáticas; e em menor quantidade nas áreas corticais, no hipocampo bem como no rim, retina e sistema vascular. Esta subfamília é expressa consoante duas variantes denominadas por D2S (cadeia curta)

predominantemente na fenda pré-sináptica e D2L (cadeia longa, em consequência do splicing alternativo), maioritariamente na fenda pós-sináptica (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Lopez Vicchi et al., 2016; Nash, 2016).

Apesar das catecolaminas influenciarem o sistema nervoso central (SNC), sabe-se que nomeadamente a dopamina poderá influenciar outros tecidos a nível periférico tal como o coração, corpo carotídeo, glândula supra-renal (sistema renina-angiotensina-aldoesterona), glândula paratiróide, e trato gastrointestinal (Estevinho & Fortunato, 2003).

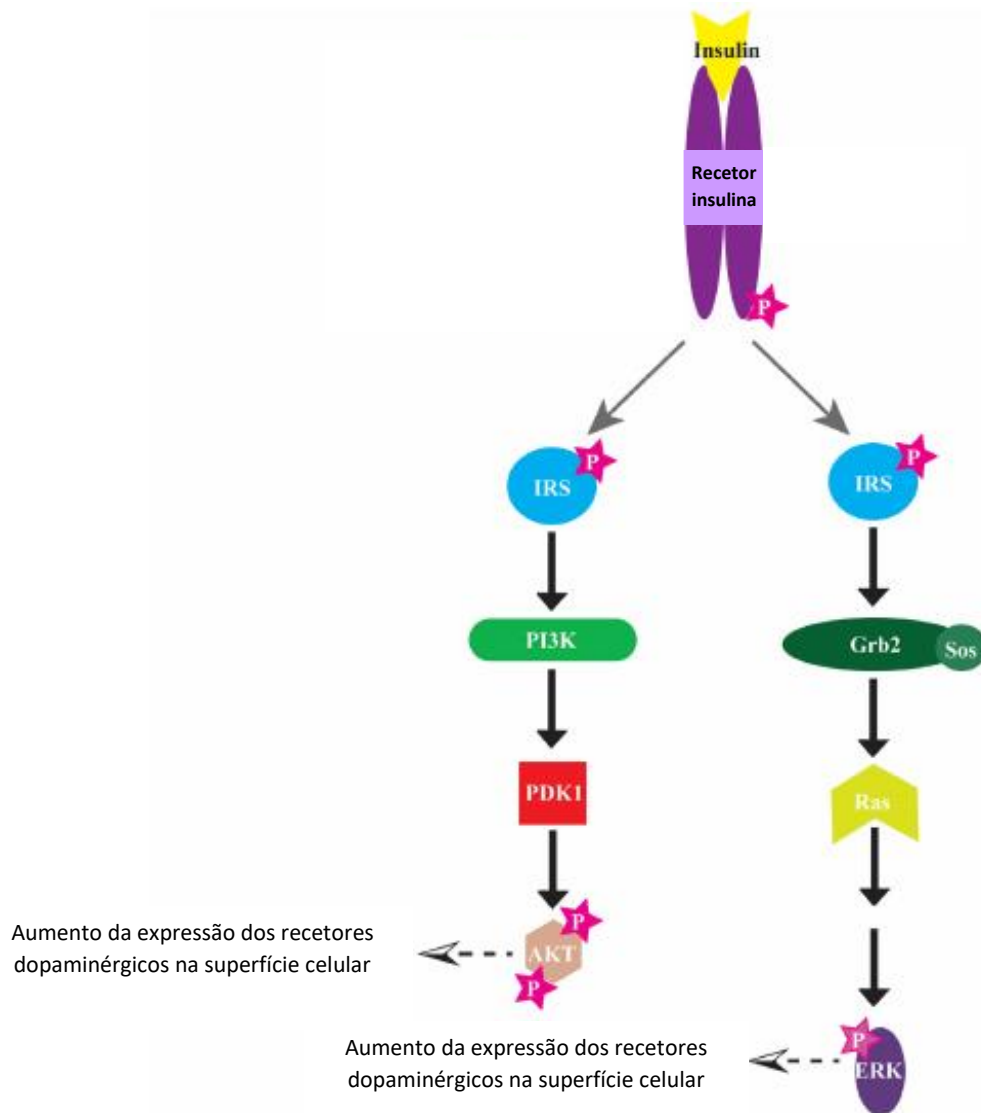
## 4. Metabolismo dos Lípidos

### **Via da Insulina:**

A insulina é responsável por manter a homeostasia da glicose e o equilíbrio energético, tendo também como função a regulação da ingestão alimentar e do peso corporal. Num estado pós-prandial, a via é desencadeada pela produção da insulina a nível da célula  $\beta$  pancreática. Esta hormona liga-se a um recetor com atividade tirosina cinase, responsável pela via de sinalização da insulina, e que vai contribuir para uma cascata de sinalização com vários intervenientes, mediando a captação periférica da glicose pela translocação de vesículas do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática do músculo esquelético e do tecido adiposo (Boyda et al., 2013; Nash, 2016). A glicose vai fornecer substrato para a síntese de glicogénio no músculo-esquelético e para a síntese de triglicéridos no tecido adiposo (Nash, 2016).

A fosforilação do recetor da insulina ativa duas vias distintas: a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (PI3K) relacionada com ações metabólicas da insulina e a via da Ras-Raf, envolvida no controlo da mitogénese. A PI3K ativa outras enzimas, incluindo a proteína cinase B (Akt), que, quando ativada, promove a inibição da *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK3 $\beta$ ), uma enzima envolvida na inibição da síntese de glicogénio. Por outro lado a GTPase (Ras) ativa MAP cinases (MAPKs) como a ERK, que pode aumentar o número de recetores dopaminérgicos

na superfície celular. Assim, a via da PI3K tem sido o foco dos trabalhos relacionados com a insulina e a dopamina, mas o papel da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) não deverá ser esquecido devido à sua interveniência em ambas as vias (figura 3) (Nash, 2016).



**Figura 3: Via de sinalização do recetor de insulina, adaptado de (Nash, 2016).**

Akt, proteína cinase B; ERK, cinase regulada por sinais extracelulares; Gr2, *growth factor receptor-bound protein*; IRS, substrato do recetor da insulina; PDK1, *phosphoinositide-dependent kinase*; PI3K, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase; Ras, Ras-Raf

Além de controlar a lipogénese no tecido adiposo, a insulina inibe a lipólise estimulada por catecolaminas, uma vez que ativa a fosfodiesterase-3-B (PDE-3B), diminuindo o cAMP e consequentemente inativando a HSL (Morigny et al., 2015; Moura & Monteiro, 2010).

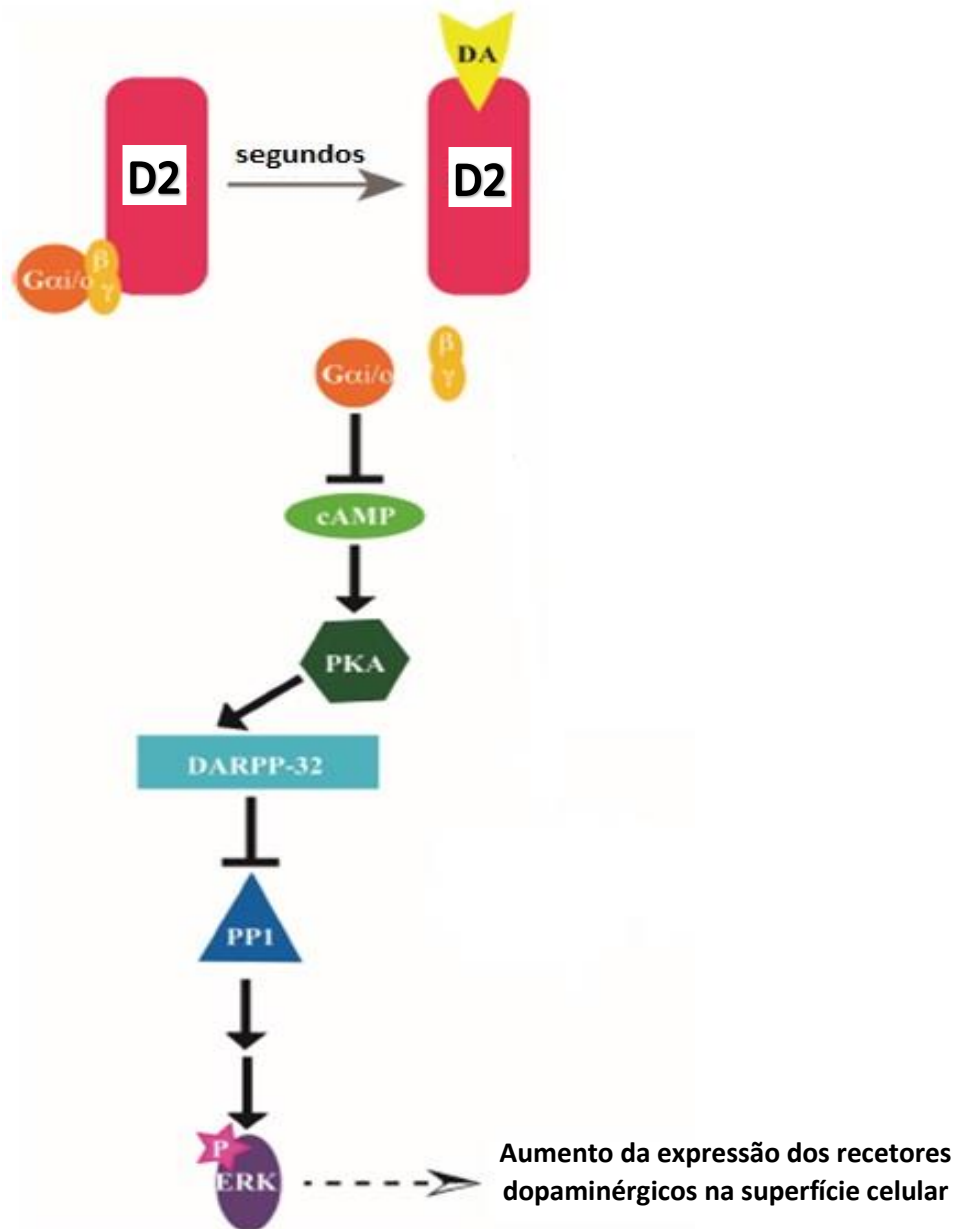
Estudos anteriores sugeriram que a HSL poderá estar envolvida na diabetes tipo 2. Ratinhos desprovidos de HSL apresentaram adipócitos heterogêneos e inflamação devido ao seu tamanho, em parte devido à desregulação da atividade do PPAR $\gamma$  (Morigny et al., 2015). Noutro estudo em animais heterozigóticos para a atividade da lípase hormono sensitiva (HSL), estes não apresentavam diferenças na adipogénese, pensando-se que a lipogénese foi compensada por uma diminuição da absorção de ácidos gordos, contribuindo para a manutenção da massa gorda. Todos os restantes parâmetros como a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina sofreram modificações benéficas (Morigny et al., 2015). Também em animais heterozigóticos para atividade da HSL foi observada uma melhoria no perfil lípidico e da glicose em jejum, mas com comprometimento da tolerância à glicose e maior propensão para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Em suma, estes resultados parecem implicar a HSL nos mecanismos de resistência à insulina. Contudo, a HSL encontra-se expressas noutros tecidos, sendo necessário o desenvolvimento de outros estudos no sentido de perceber as reais implicações da sua função no tecido adiposo (Morigny et al., 2015).

A AMPK é uma enzima responsável por aumentar a glicólise e a oxidação de ácidos gordos, e diminuir a síntese de ácidos gordos e colesterol. Esta enzima é responsável por ativar a PI3K, a AKT e mobiliza o GLUT4 para a membrana celular, aumentando assim a captação de glucose (figura 5) (P Matafome et al., 2013). Além disso, a AMPK inativa diretamente a *Fatty acid sintetase* (FAS), responsável pela formação de FFA através do Acetil-CoA e do malonil-CoA; e a acetil-coenzima A carboxilase (ACC), enzima responsável pela formação de malonil-CoA, o responsável pela inibição da captação mitocondrial de ácidos gordos (Bijland et al., 2013).

**Via das Catecolaminas:**

Durante os últimos anos foram descritos vários fatores responsáveis pela estimulação lipolítica, em particular os estímulos catabólicos, tais como: a adrenalina, a noreadrenalina, a corticotrofina e a glucagina (Watt & Steinberg, 2008). Os triglicerídeos são formados por três ácidos gordos e uma molécula de glicerol, que estão protegidos na gota lipídica por complexos proteicos que permite a sua reserva em caso de sobrecarga calórica. Em carência calórica, como no jejum ou no exercício físico, ocorre a sua hidrólise por lípases (lipólise). Desta forma, os ácidos gordos resultantes da lipólise são transportados para outros tecidos e são oxidados pela mitocôndria como fonte de energia (Guilherme et al., 2008; Ravnskjaer et al., 2015). Uma ativação adrenal simpática excessiva poderá levar a sintomas característicos da desregulação metabólico como a hiperglicemia sanguínea, a intolerância à glicose, resistência à insulina, hipertensão e dislipidémias, por aumento da lipólise (Boyda et al., 2013). Foi ainda demonstrado que a lipólise induzida pelas catecolaminas em pessoas obesas e resistentes à insulina é menor no tecido adiposo subcutâneo, mas maior no tecido adiposo visceral (Morigny et al., 2015).

A lipólise é desencadeada em resposta à deficiente secreção de insulina e é estimulada ao nível do tecido adiposo por enervação dopaminérgica através de recetores adrenérgicos, como o  $\beta 3$  (Luo & Liu, 2016). Após esta ativação sucede-se uma cascata de sinalização, que resulta na produção de cAMP, por ativação da AC, através do acoplamento às proteínas G (figura 5) (Arner & Langin, 2014; Nash, 2016; Raajendiran et al., 2016). Desta forma, ocorre a ativação da PKA, uma enzima também ativada em resposta aos níveis de fosfoproteína regulada por dopamina e cAMP (DARPP-32). A DARPP-2 é uma enzima responsável pela ativação da ERK, que parece estar intimamente relacionada com os níveis do transportador de dopamina na superfície da célula (figura 4) (Baik, 2013).

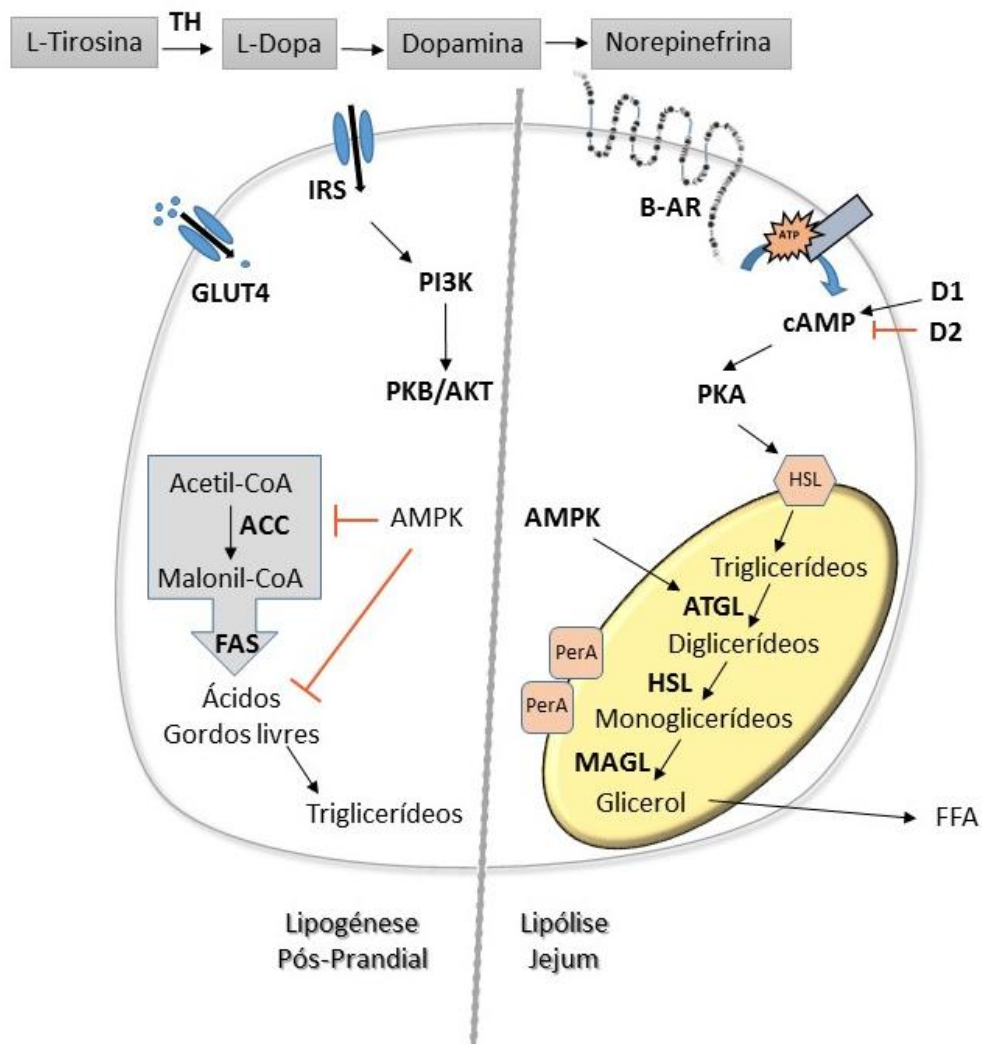


**Figura 4: Via de regulação da DARPP-32, adaptado de (Nash, 2016).**

D2, recetor dopamina 2; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; ERK, cinase regulada por sinais extracelulares; IRS, substrato do recetor da insulina; PI3K, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase; PP1, proteína fosfatase 1; PKB/AKT, proteína cinase B.



A PKA culmina na ativação da *adipose triglyceride lipase* (ATGL), uma hormona limitante da cascata lipolítica, e na HSL (figura 5) (Arner & Langin, 2014; Bartness et al., 2010; Raajendiran et al., 2016). A enzima ATGL, apesar de ser fosforilada pelo PKA e pela ERK, também é regulada pela AMPK, de forma a sustentar o aumento da oxidação mitocondrial de ácidos gordos (Bijland et al., 2013; Luo & Liu, 2016; Raajendiran et al., 2016; Watt & Steinberg, 2008).



**Figura 5: Mecanismos de regulação da lipólise e da lipogénese do tecido adiposo**

ACC, Acetil-Coenzima A carboxilase; AMPK, cinase ativada por AMP; ATGL, *adipose triglyceride lipase*;  $\beta$ -AR, recetor  $\beta$  adrenérgico; cAMP, adenosina monofosfato cíclico; GLUT4, transportador de glucose tipo 4; HSL, lípase hormona sensítiva; IRS, substrato do recetor da insulina; MAGL, monoglicérido lípase; PKB/AKT, proteína cinase B; TH, tirosina hidroxilase.

O armazenamento dos triglicerídeos em gotas lipídicas por parte dos adipócitos é conseguida através da perilipina A (PerA). Ela é responsável por impedir a ação de lipases e a circulação livre no citoplasma. Desta forma, quando ocorre o estímulo da PKA, existe a degradação da PerA, de forma a permitir o acesso da HSL aos lípidos armazenados (P Matafome et al., 2013). Este armazenamento depende da capacidade de órgãos periféricos para oxidar ácidos gordos, que é principalmente controlada pela AMPK (P Matafome et al., 2013). A hidrólise de triglicerídeos dará origem a ácidos gordos livres e à formação de diglicerídeos, monoglicerídeos e em última instância glicerol, cuja oxidação é controlada pela AMPK (Lafontan & Langin, 2009; Raajendiran et al., 2016).

## 5. Bromocriptina

A bromocriptina foi descoberta por Fluckiger em 1965, através da ação da ergolina (Kalra, Kalra, Agrawal, & Kumar, 2011). É um agonista do recetor D2 da dopamina que durante longos anos foi utilizado no controlo de várias doenças como o Parkinson, síndrome neuroléptica maligno, prolactinomas, acromegália, bem como cardiomiopatia periparto, por atuar tanto a nível do sistema nervoso autónomo como no sistema endócrino. É conhecido o seu papel na modulação das catecolaminas, como os seus efeitos nas células  $\beta$  pancreáticas (Lopez Vicchi et al., 2016). Em Maio de 2009 foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como tratamento da diabetes *mellitus* em complemento à dieta e ao exercício físico, de forma a melhorar a tolerância à glicose em adultos com diabetes tipo 2 (Lopez Vicchi et al., 2016; Mikhail, 2011; Shivaprasad & Kalra, 2011). É responsável por ativar os recetores D2, inibindo os D1, podendo também exercer funções antagonistas parciais nos recetores da serotonina (Kalra et al., 2011; Mikhail, 2011). Foi sugerido que a bromocriptina tem um efeito protetor na secreção endógena de insulina por parte das células  $\beta$  pancreáticas, no entanto não pode ser utilizada na diabetes tipo 1 (Lopez Vicchi et al., 2016). O mecanismo de ação na célula  $\beta$

pancreática ainda não é totalmente conhecido, no entanto foi sugerido que a bromocriptina atua nos recetores  $\alpha 2$ -adrenérgicos, o que faz com que iniba a secreção de insulina estimulada pela glicose. Estes contrassenso entre a ativação dos recetores D2 e dos  $\alpha 2$  na célula beta pancreáticas faz com que exista ligação entre a deteção de glicose e a secreção de insulina contribuindo para uma melhor resposta das células à hiperglicemia mas nunca conduzindo a uma hipoglicémia (Kalra et al., 2011).

Com a administração de bromocriptina, é de esperar que este fármaco exerça funções nos ritmos circadianos, que são expressos tanto a nível central como em órgãos mais periféricos (Kahn, Cooper, & Del Prato, 2014), e reduzindo as atividades elevadas de noreadrenalina e serotonina no hipotálamo ventromedial (VMH), e reduzindo os níveis do neuropéptido Y nos núcleos paraventriculares. Num estado normal, sensível à insulina, os neurónios hipolatâmicos detetam glicose e ácidos gordos, induzindo alterações neuroquímicas autónomas e neuroendocrinas para melhorar a sensibilidade periférica à insulina e diminuir a glicose pós-prandial. Em estados resistentes à insulina, este mecanismo é perturbado, em grande parte devido à elevada atividade noreadrenérgica no VMH e da resposta diminuída da insulina. A terapia com bromocriptina melhora esta resposta hipotalâmica, reduzindo a glicose pós-prandial, a atividade de VMH na norepinefrina e na serotonina. No entanto, é ainda necessário esclarecer quais os mecanismos envolvidos nestes efeitos (DeFronzo, 2011; Kumar, Kumar, & Janardan, 2012; Schwartz & Zangeneh, 2016).

Em humanos, a dose varia de 1.6 a 4.8 mg tomado com comida, logo pela manhã, depois de duas horas acordado. Pode ser utilizado como único tratamento ou em combinação com outro antidiabético oral, como as biguanidas (metformina) e sulfonilureias (Kalra et al., 2011; Lopez Vicchi et al., 2016). Este fármaco é eficaz no controlo da glicemia por redução da hemoglobina glicada A1C (HbA1c) entre 0,1 e 0,4%, pela redução da lipogénese mas também da lipólise, assim como perda de peso, diminuição da glicémia e triglicérideos e melhoria da sensibilidade à insulina (Kalra et al., 2011; Lopez Vicchi et al., 2016). Poderá ter efeitos secundários como

náuseas, fadiga, tonturas, hipotensão ortostática, vômitos e cefaleias, contudo não é visível hipoglicemia, nem hipotensão (Siddiqui et al., 2013).

A bromocriptina não é recomendável a pacientes com distúrbios psicóticos graves porque os agonistas do recetor da dopamina podem agravar os distúrbios psicóticos ou reduzir a eficácia dos medicamentos prescritos para essas condições (Schwartz & Zangeneh, 2016).

## **Capítulo II: Objetivos**

## Objetivos

A obesidade é um fator de risco para a síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e DM2, devido ao desenvolvimento da insulino-resistência. A degradação do armazenamento de lípidos é conhecida por causar inflamação de baixo grau, assim como resistência à insulina e lipólise, que por sua vez leva à deposição ectópica de lípidos no músculo e no fígado. Desta forma, o principal objetivo deste trabalho consiste em:

- Avaliar o potencial terapêutico da Bromocriptina, um agonista D2 na modulação da sinalização dopaminérgica do tecido adiposo num modelo animal diabético obeso;
- Estudar o mecanismo de ação deste fármaco no tecido adiposo periepidual;
- Avaliar os efeitos da bromocriptina na melhoria da insulino-resistência e na melhoria do fenótipo de Diabetes *Mellitus* tipo 2.

## **Capítulo III: Material e Métodos**

## 1. Material e Métodos

### 1.1. Reagentes Utilizados

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram obtidos na Sigma Aldrick (EUA). Os anticorpos usados foram dirigidos contra: Calnexina (Sicgen, Portugal), D1R, D2R, IR-T, IR-P, GLUT4 (Abcam, Reino Unido), AKT-T, AKT-P, HSL-T, HSL-P, AMPK-T, AMPK-P, FAS, ACC-T, ACC-P (Cell Signaling, EUA) e  $\beta 3$  (Alomone Labs, Israel).

### 1.2. Modelos Animais

Neste trabalho foram utilizados duas estirpes de animais diferentes, os *Goto-Kakizaki* (GK), ratos diabéticos não obesos, e ratos *Wistar* (W) normais usados como grupo controlo. Ambas as estirpes foram provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e mantidos em condições padrão de ventilação, temperatura (22-24°), humidade (50-60%), com um ciclo de luz/escuridão de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos foram validados pela Direção Geral de Veterinária e supervisionados por pessoas detentoras de um curso válido pela Federação Europeia das Associações Científicas e de Experimentação Animal – FELASA, com certificação Geral de Veterinária.

Os animais *Wistar* foram usados como controlos, enquanto que os animais GK, todos machos, foram divididos em 4 grupos de estudo (n=8):

1. Ratos controlo *Wistar* (WC) com dieta padrão (A03, SAFE, Barcelona);
2. Ratos diabéticos *Goto-Kakizaki* (GKC) com dieta padrão (A03, SAFE, Barcelona);
3. Ratos diabéticos obesos *Goto-Kakizaki* (GKHFD) com dieta enriquecida em gordura e sacarose (A03 HIGH FAT, SAFE, BARCELONA);
4. Ratos diabéticos obesos *Goto-Kakizaki* com dieta enriquecida em gordura e sacarose e administrados com bromocriptina (GKHFDBr);





### 1.3.2. Monitorização do Peso e Ração

Os animais dos diferentes grupos foram alimentados consoante a ração estipulada para o seu grupo de estudo, (item 1.3.1). Os grupos *Wistar* e *GK* foram alimentados com a dieta normal durante os 6 meses de vida, enquanto que os grupos com a dieta enriquecida em gordura e sacarose foram alimentados com a mesma entre o 1° e o 6° mês de vida. A monitorização da quantidade de ração ingerida foi iniciada ao 1° mês de vida dos animais, e feita semanalmente ao longo de todo o período experimental. O peso corporal foi também avaliado, de 4 em 4 semanas durante todo o estudo, sendo considerado o peso inicial os valores obtidos ao 1° mês de vida.

### 1.3.3. Parâmetros Sistémicos

**Prova de Tolerância à Insulina:** No final do período experimental, após um jejum de 6 horas, foi administrada insulina a (0,25U/ml) por via i.p. e foi medida a glicemia na veia da cauda a 30, 60 e 120 minutos após, utilizando um glicómetro (ContourNext, Bayer, Portugal), com as respetivas tiras teste.

Foram ainda avaliados os níveis plasmáticos de insulina, através de sangue recolhido pela veia da cauda após um jejum de 6 horas, pela utilização do Rat Insulina ELISA Kit (Mercodia, Suécia).

**Avaliação do Perfil Lipídico:** No mesmo dia da prova de tolerância à insulina, e antes da administração da mesma, foram avaliados os triglicéridos e o colesterol total na veia da cauda (Colesterol e Triglicéridos), recorrendo a um medidor portátil (Accutrend Plus, Roche, Portugal) e respetivas tiras teste.

**Determinação da Glucagina:** Foi avaliado os níveis plasmáticos de glucagina plasmática, com as mesmas amostras de plasma utilizados para o kit de insulina, utilizando o Rat Glucagon ELISA Kit (Wako, Alemanha).

**Colheita de Sangue e Recolha de Tecidos:** Foram colhidas amostras de sangue por punção cardíaca no dia do sacrifício, após jejum *overnight* e mediante a anestesia prévia, por uma solução de cetamina (75mg/Kg) e clorpromazina (3mg/Kg) (Eickhoff, Louro, Matafome, Seíça, & Castro e Sousa, 2014). Os sangues foram divididos em tubos para isolamento de plasma (Vacuette K3E K3 EDTA) e soro (Vacuette Zserum sep clot ativador), centrifugado a 2000 xg, durante 15min, a 4°C e alíquotado em tubos de 200µl que posteriormente foi congelado a -80°C. De seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o TAE foi recolhido e guardado a -80°C.

## 1.4. Estudos *in vitro*

### 1.4.1. Determinação dos Níveis de Proteína no TAE - Western *Blotting*

**Preparação dos Homogeneizados:** Foram homogeneizados 100mg de TAE em 1ml de tampão de lise (25mM de Tris-HCL pH7.4; 100mM NaCl; 1% Triton X-100; 5mM EDTA; 5mM EGTA; 20mM NaF, 10mM; β-Glicerolfosfato; 2,5mM Pirofosfato de sódio; 10mM NaVO<sub>3</sub>; 10 mM PMSF; 90µl de *cocktail* inibidor de proteases (Sigma USA), pH7,4). As amostras foram mantidas em gelo durante o protocolo e centrifugadas a 14000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Foram ainda recolhidos os sobrenadantes, alíquotados e guardados a -80°C. Adicionado posteriormente o tampão de desnaturação (*Sample Buffer 2x*) (tabela 1) numa proporção de 1:1, às alíquotas que iriam ser utilizadas no momento, tendo sido sonicadas durante cerca de 10 segundos e fervidas a aproximadamente 100°C durante 5 minutos.

**Eletroforese (SDS-PAGE):** Foram polimerizados géis, que variaram de 8% a 12%, dependendo do tamanho da proteína pretendida, com 1 mm de espessura e com 10 poços. Foi adicionado o marcador de peso molecular *GRS Protein Marker MultiColour* (Grisp, Portugal), num dos poços, e foi preenchido por tampão de corrida (125mM Tris-base; 480mM glicina; 1% SDS, pH,8,8,) até ao topo, ocorrendo a migração das proteínas unicamente consoante o seu peso molecular. As soluções *Resolving* e *Stacking* utilizadas para a preparação dos géis constam na tabela 1.

**Transferência do Gel para a Membrana de PVDF:** Após o término da eletroforese vertical, procedeu-se à ativação das membranas de *polyvinylidene fluoride* (PVDF). De seguida, foi colocado o gel em contacto com a membrana através da utilização de uma solução de transferência (tabela 1), durante cerca de 1h45min, em amperagem constante (750mA). Posteriormente à transferência, as membranas foram incubadas com uma solução de TBST 0,1% com a adição de 5% de *Bovine Serum Albumin* (BSA), durante duas horas, de maneira a garantir a maior especificidade dos anticorpos.

**Marcação com Anticorpos:** Após a fase de bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos específicos (calnexina, D1, D2,  $\beta$ 3, IR-T, IR-P, AKT-T, AKT-P, GLUT4, HSL-T, HSL-P, AMPK-T, AMPK-P, FAS, ACC-T, ACC-P) overnight, a 4°C. Na manhã seguinte foram lavadas com solução TBS-T a 0,4% (tabela 1), durante uma hora, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário correspondente ao primário anti-coelho, anti-cabra e anti-ratinho (BioRad, EUA), durante duas horas e à temperatura ambiente.

**Revelação das Membranas:** As membranas foram reveladas com o substrato *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) numa proporção de 1:1, usando o kit (*Clarity Western ECL Substrate*, BioRad, EUA). Este substrato foi adicionado à membrana e a revelação foi conseguida através do uso do sistema de deteção de luminescência *VersaDoc* (BioRad, EUA), com recurso ao programa informático *Quantity One* (BioRad, EUA). Após a leitura das membranas a sua quantificação teve por base o *software* Image Quant (Molecular Dynamics, EUA).

**Tabela 1: Soluções utilizadas na técnica de Western Blotting**

<b>Sample Buffer (2x):</b> 625mM Tris-HCl 10% Glicerol 2% SDS 5% $\beta$ -mercaptoetanol 0,5% azul de bromofenol	<b>Tampão transferência, pH 11:</b> 100 mM CAPS
<b>Tampão Resolving, pH8,8:</b> 0,75 mM Tris-HCl 0,2% SDS	<b>Solução TBS, pH7,6:</b> 25 mM Tris-HCl 150mM NaCl
<b>Tampão Staking, pH 6,8:</b> 0,25mM Tris-HCl; 0,2 SDS	<b>Solução TBS-T, pH 7,6:</b> 25 mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 1% de Tween20

## 2. Análise Estatística

Os resultados foram analisados com recurso ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis devido ao número de amostras por grupo ser inferior ao limiar da normalidade, com recurso ao *software* IBM SPSS Statistics. Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Foram considerados valores com diferenças estatísticas significativas se  $p < 0,05$ .

## Capítulo IV: Resultados

## 1. Monitorização do Peso e Ração

Devido ao fato de os animais terem sido alimentados com uma dieta rica em gordura e em sacarose, torna-se necessário avaliar parâmetros tais como: a ração ingerida (g), ingestão calórica (Kcal), peso corporal ao sacrifício (g), e peso do TAE (g) entre os 5 e os 6 meses de idade (g). Desta forma é possível verificar que o grupo GKHFDBr apresenta uma diminuição significativa da ração ingerida e das calorias associadas em relação aos grupos controlo e diabético não obeso (GK) ambos com valores de ( $p < 0,01$ ), assim como ao grupo obeso (GKHFD) ( $p < 0,001$ ) (tabela 2). No entanto, foi também observada uma diminuição no grupo tratado com o veículo, sugerindo que o manuseamento dos animais afeta o consumo da dieta e diminui a ingestão calórica ( $p < 0,01$  vs GKHFD) (tabela 2).

Relativamente ao peso corporal, os animais W, aos 6 meses de idade, têm maior peso corporal em comparação com os restantes grupos, sendo essa diferença maior em relação aos ratos GK controlo ( $p < 0,01$ ) e atenuada pelo consumo da dieta rica em gorduras ( $p < 0,05$ ). O peso corporal não foi afetado pelo tratamento com bromocriptina. Contudo, é visível uma diferença considerável no peso do tecido adiposo periepididimal do grupo administrado com fármaco em relação ao grupo controlo com valores de ( $p < 0,01$ ) e ao grupo tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ) (tabela 2).

**Tabela 2: Representação esquemática da ração ingerida no último mês (g) ingestão calórica para esse período (Kcal), peso corporal no dia do sacrifício (g), e peso do TAE (g) para os diferentes grupos de estudo.**

Grupo	W	GK	GKHFD	GKHFDBr	GKHFDVh
Ração (g/rato/dia)	21,6±0	21,6±0,7	23,7±0,9	15,4±1,3	18,8±0,1
				**##\$\$\$	\$\$
Ingestão calórica (Kcal/rato/dia)	61,0±0	61,1±2,0	67,1±2,5	43,5±3,7	53,2±0,2
				**##\$\$\$	\$\$
Peso corporal sacrifico (g)	441,3±11,1	385±7,8	392,3±8,6	395,3±4,9	398,6±11,3
		**	*	*	*
Peso TAE (g)	5,6±0,7	3,7±0,2	3,9±0,3	2,6±0,5	4,7±0,3
		*		**&	

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFDVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; \$ vs GKHFD; & vs GKHFDVh. 1 símbolo p<0.05; 2 símbolos p<0.01; 3 símbolos p<0.001.

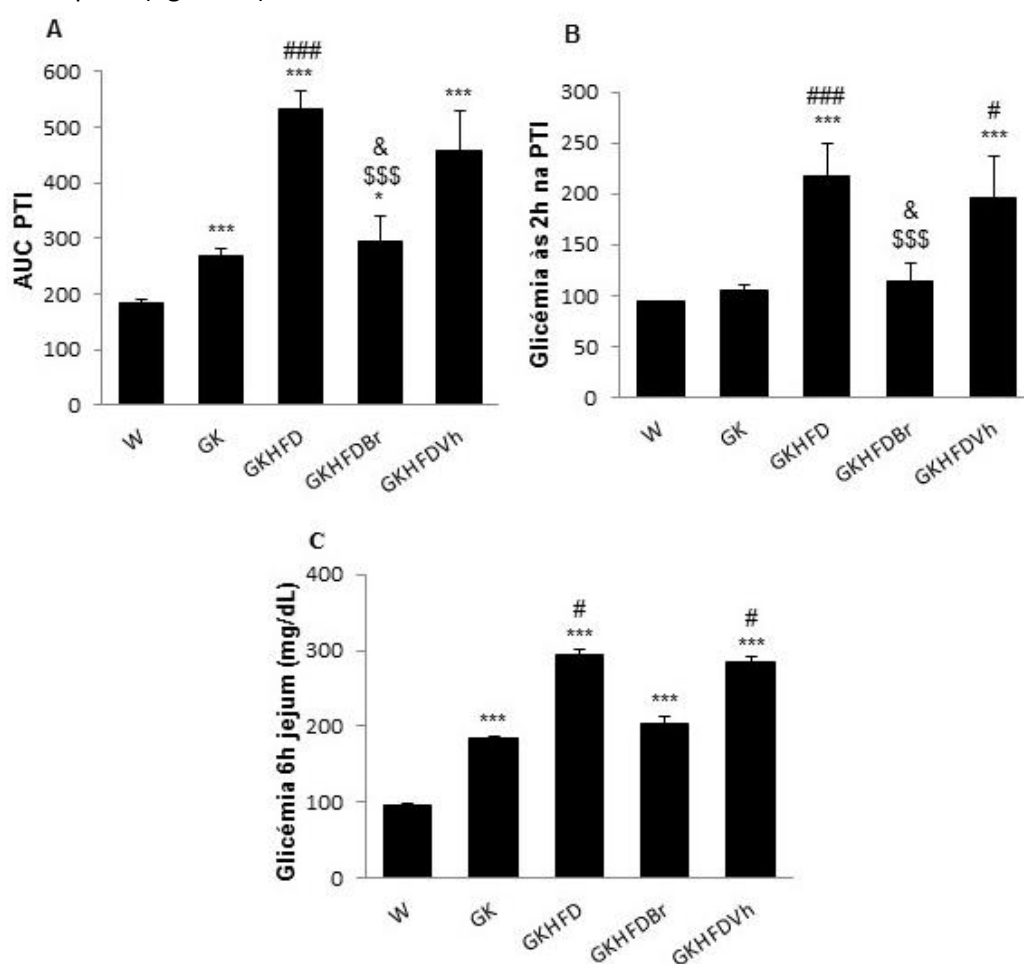
## 2. Avaliação dos Parâmetros Sistêmicos

### 2.1. Tolerância à Glicose e Sensibilidade à Insulina

Visto que os animais diabéticos tipo 2 apresentam uma hiperglicemia moderada, torna-se imprescindível a verificação da prova de tolerância à insulina (PTI), assim como a resistência periférica à mesma. Desta forma verifica-se que os animais controle apresentam uma menor área debaixo da curva (AUC) durante a PTI em comparação com os ratos GK controle (p<0,001). O grupo GKHFD, devido à alimentação hipercalórica apresenta uma maior área debaixo da curva em relação ao grupo W e GK (p<0,001), e os animais GKHFDBr reverteram esse fenótipo pela administração da bromocriptina, quer em relação ao grupo GKHFD (p<0,001), quer em relação ao grupo GKHFDVh (p<0,05) (figura 7A).



Os valores de glicose obtidos às duas horas na prova de tolerância à insulina e às 6 horas em jejum coincidem com os resultados obtidos pela AUC, onde é possível verificar, mais uma vez, que os animais do grupo GKHFD apresentam um agravamento da glicemia às 2h durante a PTI e da glicemia em jejum em relação ao grupo controlo ( $p < 0,001$ ) e diabético ( $p < 0,001$  às 2h e  $p < 0,05$  em jejum) (figura 7B-C). Os animais tratados com bromocriptina, apresentaram uma redução significativa da glicemia às 2h em relação ao grupo GKHFD, com ( $p < 0,001$ ) e GKHFVh ( $p < 0,05$ ) (figura 7B), mas também da glicemia em jejum, pois a diferença entre os grupos de dieta gorda e o grupo GK com dieta normal deixa de se verificar nos animais tratados com bromocriptina (figura 7C).

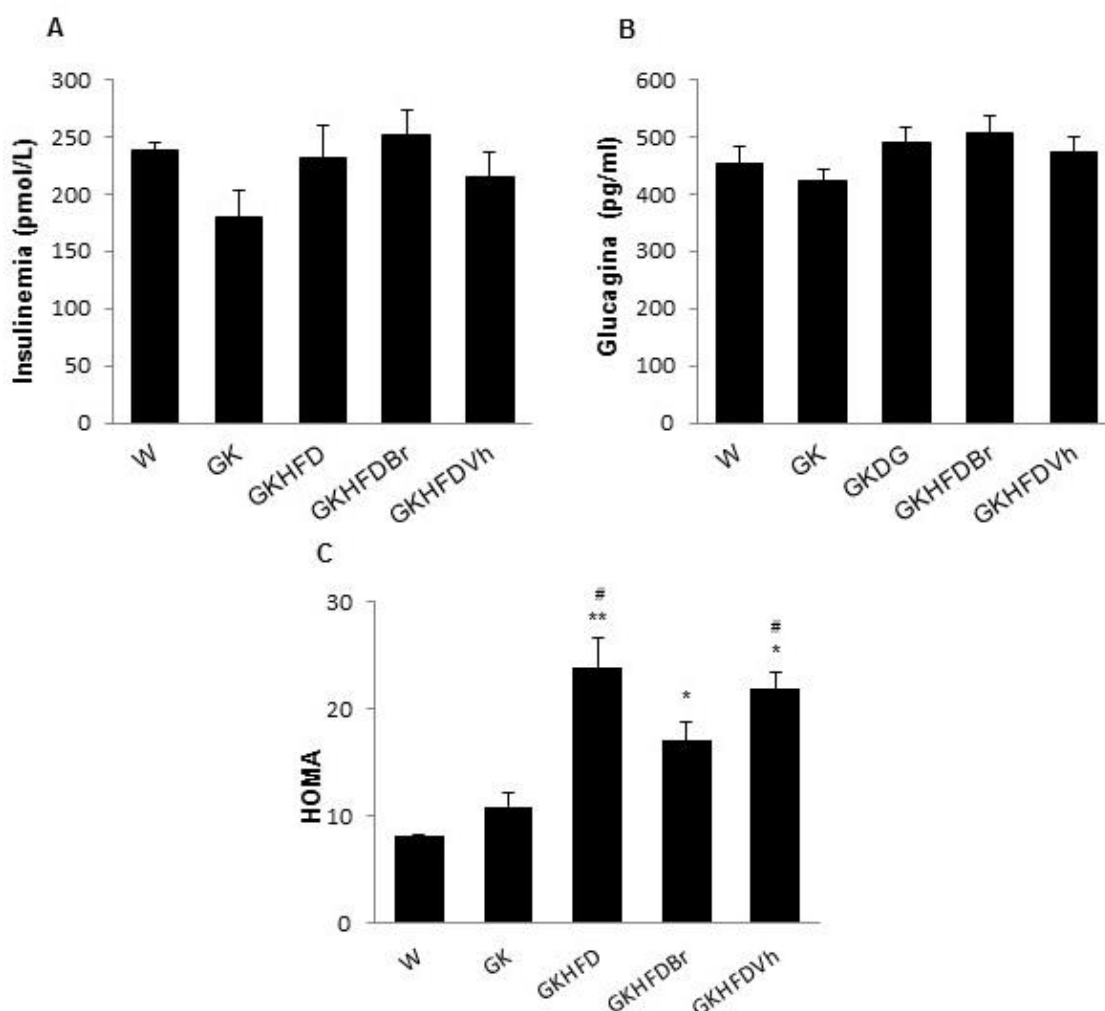


**Figura 7: Área debaixo da curva (AUC) na prova de tolerância à insulina (A), glicemia às duas horas na mesma prova (A), e valores da glicemia após 6 horas de jejum (B).**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; \$ vs GKHFD; & vs GKHFVh. 1 símbolo  $p < 0,05$ ; 3 símbolos  $p < 0,001$ .

## 2.2. Insulinemia, Glucagina e HOMA

Os níveis plasmáticos da insulina (figura 8A) e da glucagina (figura 8B), obtidos por ELISA kit, não mostram diferenças estatísticas entre os grupos em estudo. Contudo, foi possível verificar, por meio do *homeostatic model assessment* (HOMA), um método utilizado para quantificar a resistência à insulina, que os animais GKHFD apresentam um agravamento da insulino-resistência em relação ao grupo controlo ( $p < 0,01$ ) e ao grupo diabético não obeso ( $p < 0,05$ ). Observou-se também que os animais administrados com bromocriptina reduziram parcialmente a resistência à insulina, aproximando-se do grupo GK controlo (figura 8C).

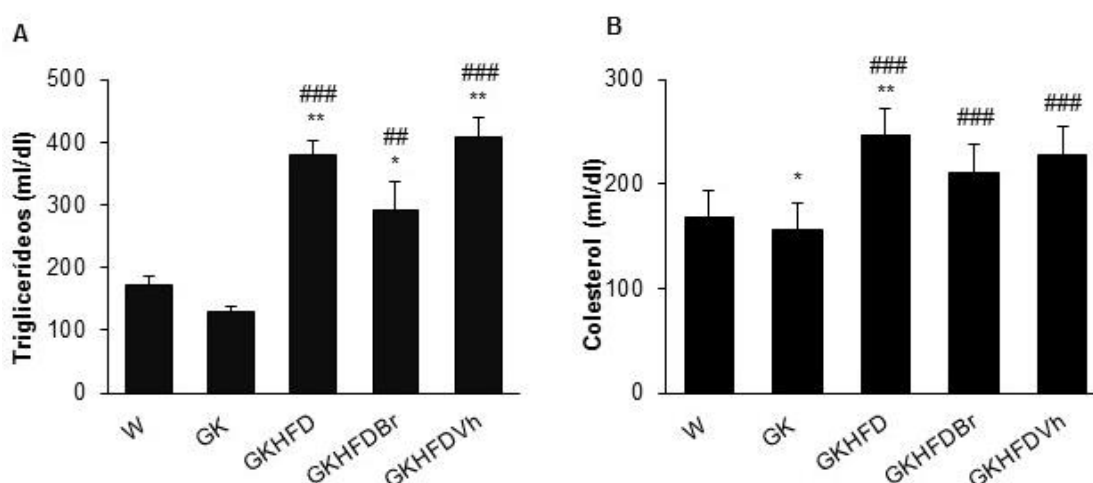


**Figura 8: Níveis de insulinemia (A), glucagina (B) e HOMA (C).**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFVDh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK. 1 símbolo  $p < 0,05$ ; 2 símbolos  $p < 0,01$ .

### 2.3. Perfil Lipídico

De acordo com os valores obtidos pela medição dos lípidos, é possível verificar que os animais diabéticos obesos apresentam um aumento, tanto dos níveis de triglicerídeos, como de colesterol em relação aos grupo controlo ( $p < 0,01$ ) e diabético ( $p < 0,001$ ) (figura 9A e 9B). Com a administração de bromocriptina o perfil lipídico melhorou. Contudo, a diminuição dos triglicerídeos foi mais notória, reduzindo a diferença em relação ao grupo W ( $p < 0,05$ ) e GK controlo ( $p < 0,01$ ) (figura 9A). Não se verificaram diferenças significativas nos níveis de colesterol após o tratamento com bromocriptina (figura 9B).



**Figura 9: Níveis séricos (A) de triglicerídeos e colesterol total (B).**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFDVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; \$ vs GKHFD; & vs GKHFDBr. 1 símbolo  $p < 0,05$ ; 2 símbolos  $p < 0,01$ ; 3 símbolos  $p < 0,001$ .

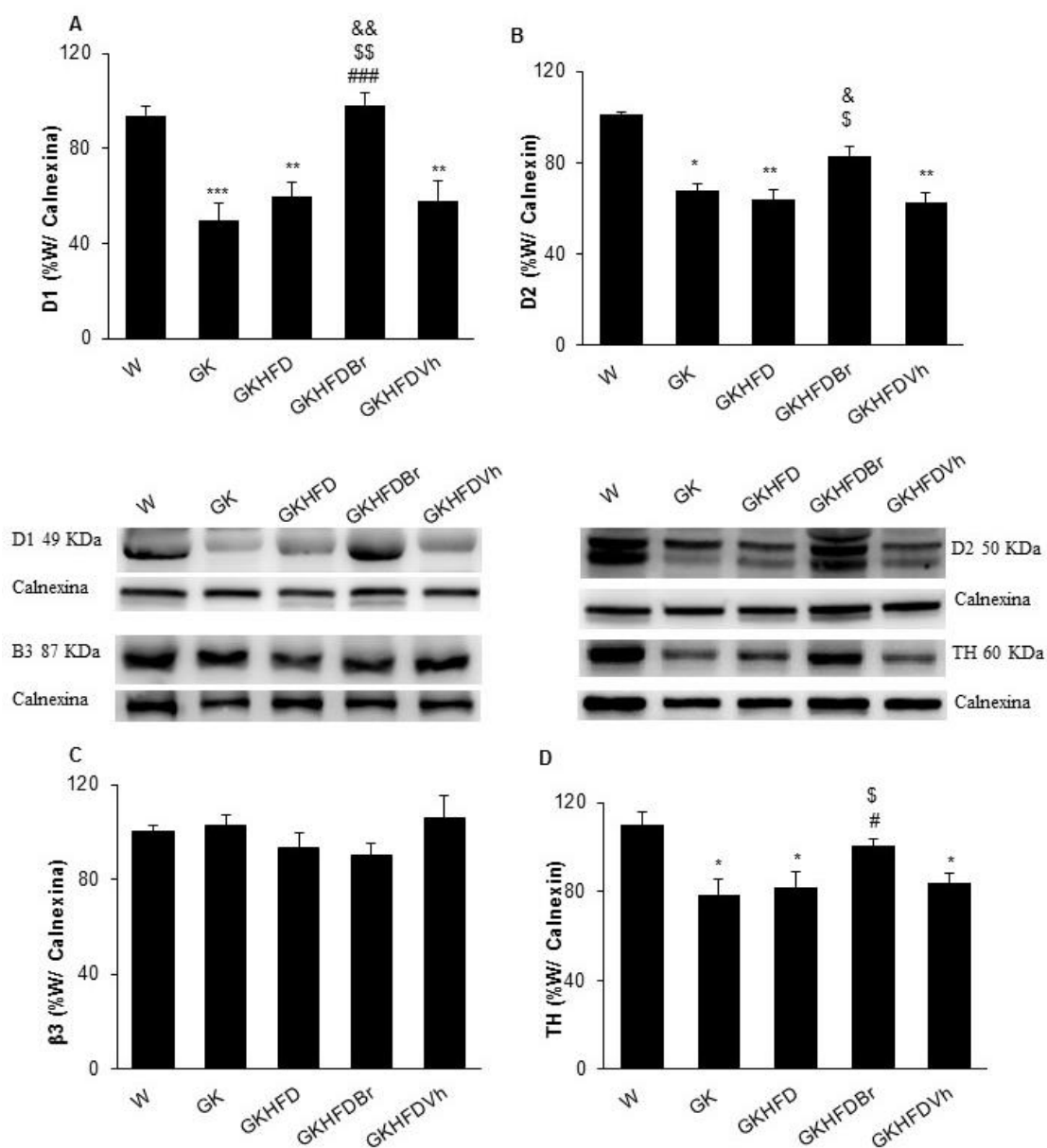
### 3. Detecção de Proteínas *in vitro* por Western Blotting

#### 3.1. Recetores Dopaminérgicos, Adrenérgicos e Enzimas Envolvidas

Sabendo que a bromocriptina é um agonista do recetor D2 da dopamina, torna-se fulcral a avaliação da sinalização dopaminérgica no tecido adiposo, neste caso no TAE. Desta forma, os animais GK controlo apresentaram uma diminuição dos recetores D1 ( $p < 0,001$ ) e D2 ( $p < 0,05$ ), em comparação com os ratos *Wistar*. Resultados similares foram observados nos grupos GKHFD e GKHFVh, com uma diminuição significativa da expressão destes recetores em comparação com o grupo controlo (figura 10A-B).

O tratamento com bromocriptina reverteu completamente este processo para os recetores D1, com valores semelhantes aos animais W e superiores aos ratos GK controlo ( $p < 0,001$ ), GKHFD e GKHFVh ( $p < 0,01$ ) (figura 10A). Para o recetor D2, é possível verificar que a dieta gorda (GKHFD e GKHFVh) aumentou as diferenças estatísticas para o grupo W ( $p < 0,01$ ). Os animais GKHFDBr reverteram parcialmente esse processo, demonstrando um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos GKHFD e GKHFVh (figura 10B).

Uma vez que a sinalização adrenérgica é conhecida por regular o metabolismo lipídico do tecido adiposo, foram analisados os níveis do recetor adrenérgico  $\beta_3$ , que foram semelhantes nos diferentes grupos de estudo (figura 10C). Analisámos, ainda, a enzima responsável pela síntese de L-DOPA, um precursor da dopamina, tendo-se verificado níveis menores da expressão desta enzima, quando em comparação com os grupos GK, GKHFD e GKHFVh ( $p < 0,05$ ). No entanto, os animais aos quais foi administrada a bromocriptina mostraram um incremento da expressão de TH em relação ao diabético e diabético obeso ( $p < 0,05$ ), para valores próximos dos animais controlo (figura 10D).



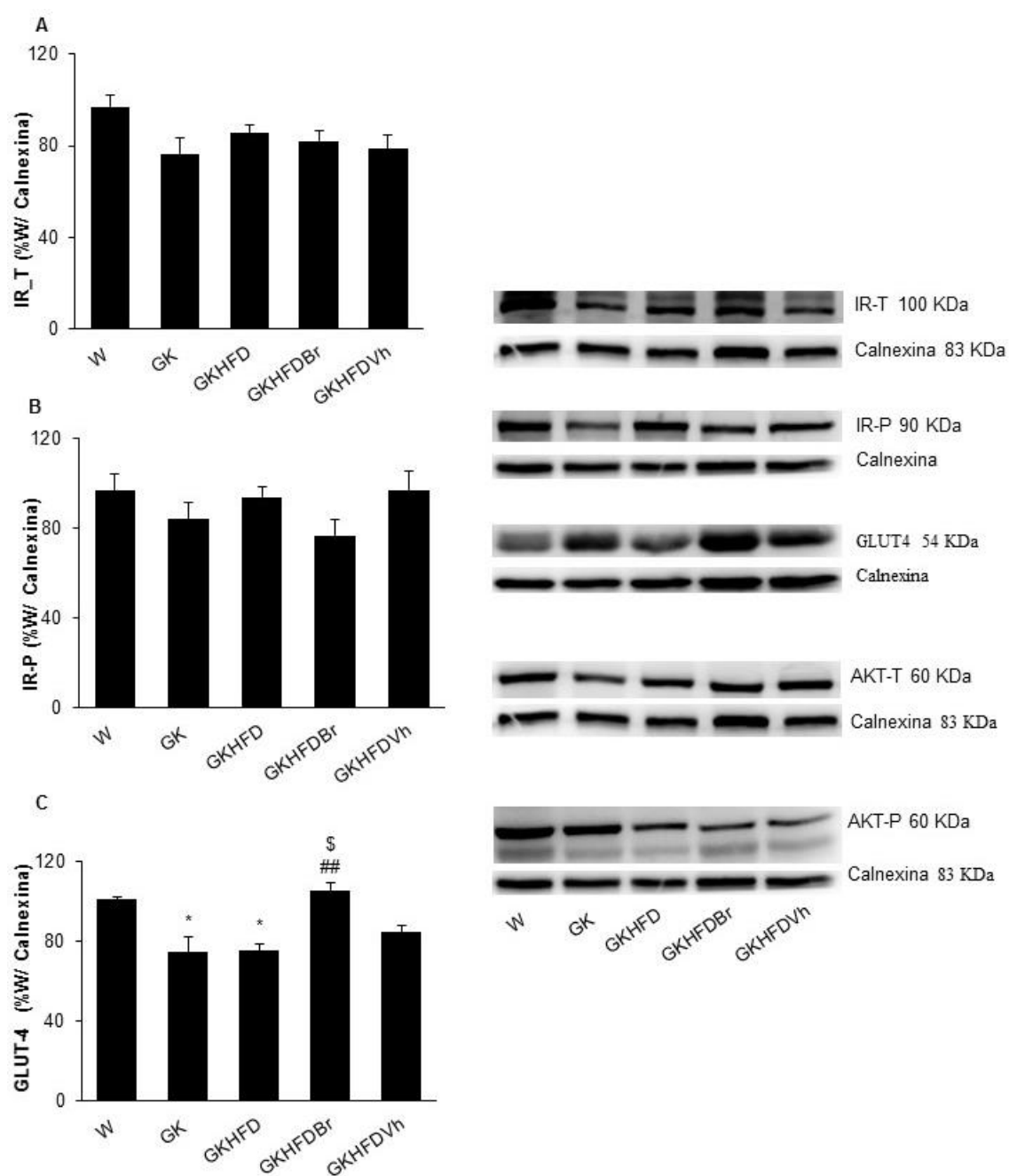
**Figura 10: Análise por Western Blotting dos níveis do recetor D1 (A) e D2 (B), do recetor adrenérgico β3 (C) e da enzima TH (D).**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFDVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; \$ vs GKHFD; & vs GKHFDVh. 1 símbolo  $p < 0.05$ ; 2 símbolos  $p < 0.01$ ; 3 símbolos  $p < 0.001$ .

### 3.2. Marcadores de Insulino-resistência

Tendo em vista o objetivo deste trabalho, foi imprescindível verificar os efeitos da enervação dopaminérgica nos mecanismos associados ao metabolismo da glicose e dos ácidos gordos no tecido adiposo, nomeadamente na insulino-resistência. Desta forma, avaliámos o recetor da insulina na sua forma total e fosforilada, não se tendo observado diferenças relevantes entre os diferentes grupos de estudo (figura 11A e 11B).

No entanto, verificámos uma diminuição dos níveis do GLUT4 nos grupos GK e GKHFD em relação ao grupo W ( $p < 0,05$ ). Verificou-se, ainda, um aumento significativo da expressão desta proteína no grupo administrado com bromocriptina, em relação ao grupos GK ( $p < 0,01$ ) e GKHFD ( $p < 0,05$ ) (figura 11C).

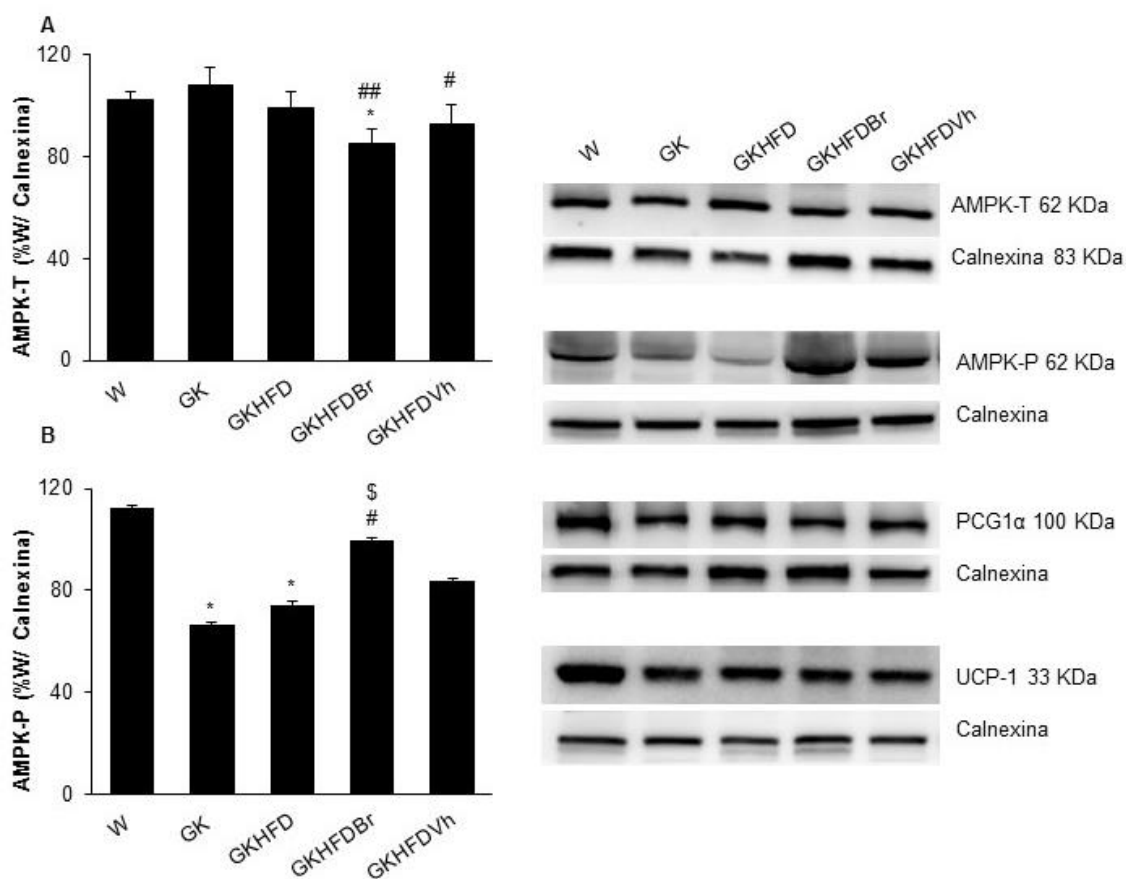


**Figura 11: Análise por Western Blotting do receptor da insulina na sua forma total (IR-T) (A) e fosforilada (IR-P) (B), e do transportador de glucose (GLUT4) (C).**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFDVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; § vs GKHFD; & vs GKHFDVh. 1 símbolo  $p < 0.05$ ; 2 símbolos  $p < 0.01$ ; 3 símbolos  $p < 0.001$ .

### 3.3. Marcadores Envolvidos na Oxidação Lipídica

No sentido de avaliar o efeito da bromocriptina nos mecanismos relacionados com a oxidação de ácidos gordos, avaliou-se a AMPK, o PGC-1 $\alpha$  e a UCP-1. Verificou-se uma diminuição da expressão da enzima AMPK, no grupo tratado com bromocriptina em relação ao grupo W ( $p < 0.05$ ) e GK ( $p < 0.01$ ), que foi também parcialmente observada no grupo GKHFDVh ( $p < 0,05$  vs GK) (figura 12A). Na forma fosforilada da proteína, verificou-se uma diminuição nos grupos GK e GKHFD em relação ao grupo controlo ( $p < 0.05$ ). A bromocriptina reverteu totalmente esta diminuição, em relação aos grupo GK e GKHFD ( $p < 0.05$ ) (figura 12B). Não se verificaram diferenças estatísticas nos níveis do PGC-1 $\alpha$  e da UCP-1.



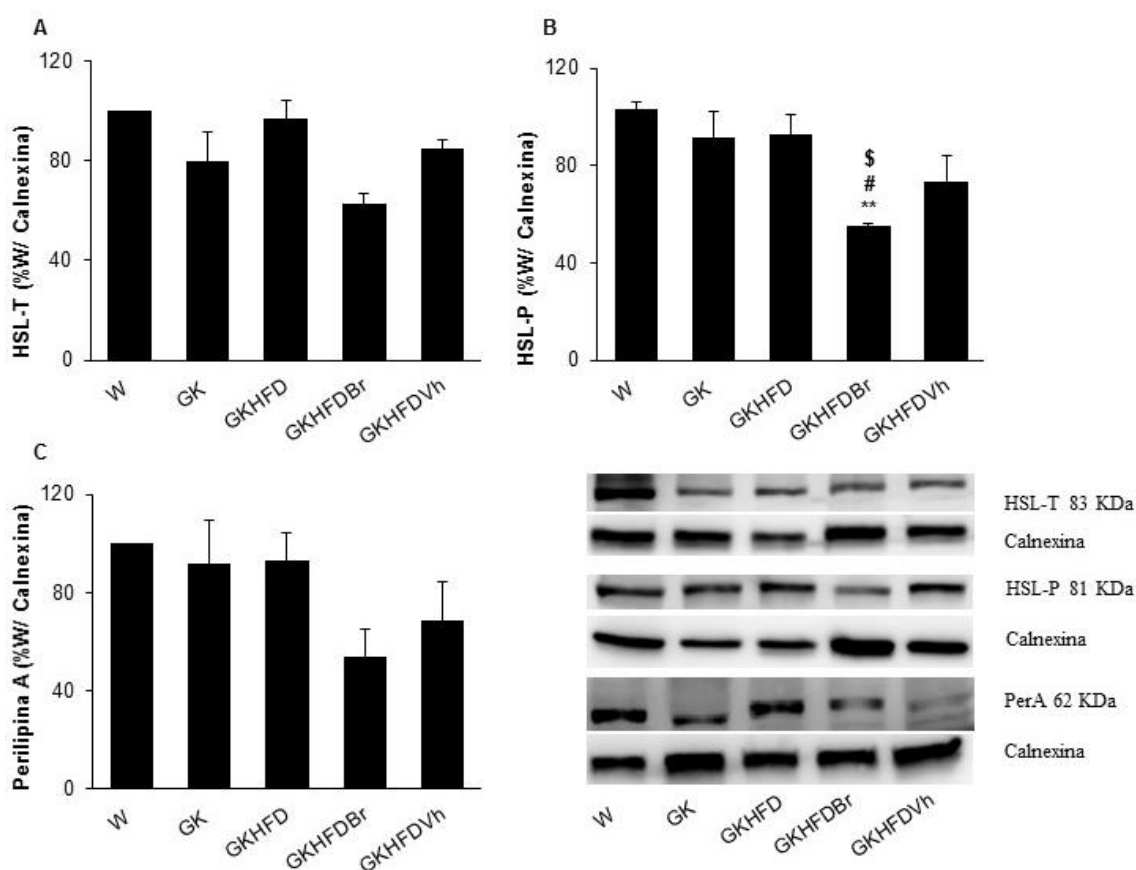
**Figura 12: Análise por Western Blotting da AMPK na forma total (A) e na forma fosforilada (B)**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFDVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; \$ vs GKHFD; & vs GKHFDVh. 1 símbolo  $p < 0.05$ ; 2 símbolos  $p < 0.01$ ; 3 símbolos  $p < 0.001$ .



### 3.4. Marcadores Relacionados com o Armazenamento e Formação de Ácidos gordos.

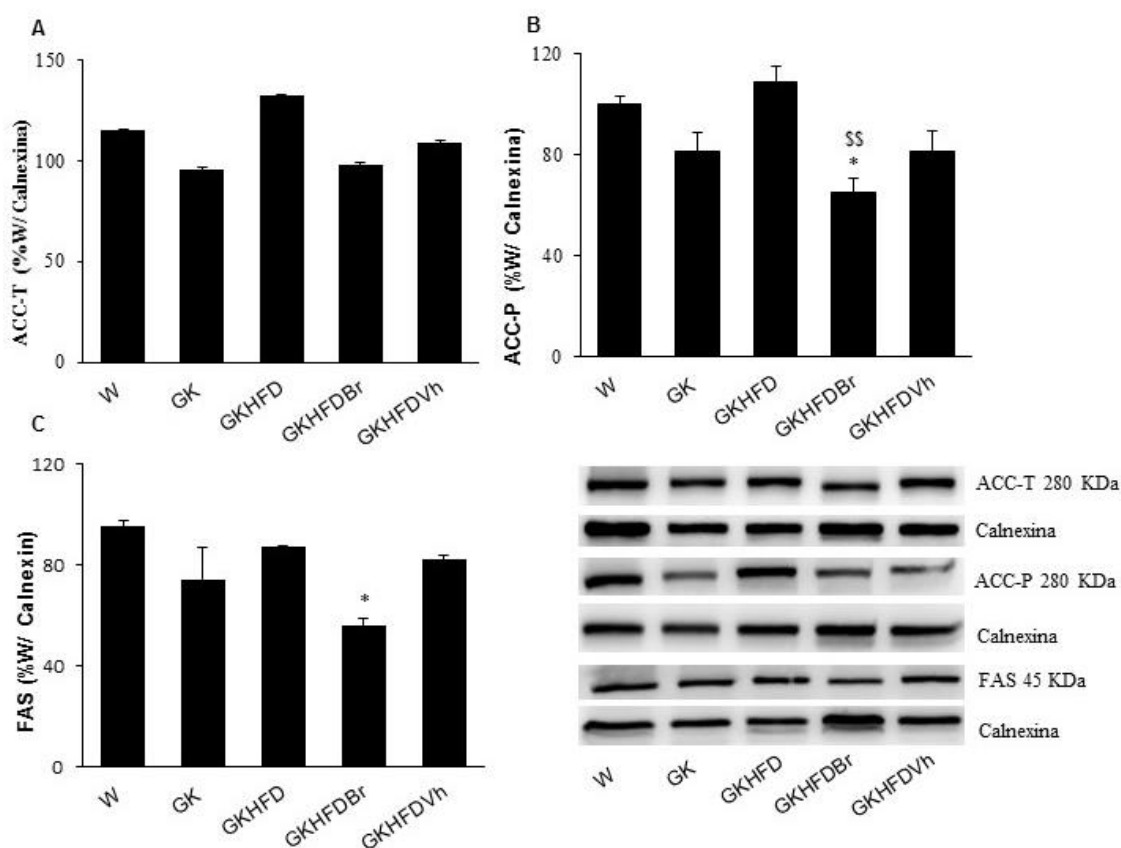
Em relação aos mecanismos de armazenamento lipídico, foi possível verificar que os níveis totais da PerA e da HSL mostram níveis similares entre os diferentes grupos de estudo, com uma tendência não significativa para uma diminuição no grupo GKHFDBr (figura 13C). Pelo contrário, a HSL-P, em jejum, apresenta uma diminuição dos seus níveis no grupo ao qual foi administrada bromocriptina, em comparação com o grupo W ( $p < 0,01$ ), GK e GKHFD ( $p < 0,05$ ) (Figura 13B).



**Figura 13: Análise por Western Blotting das proteínas HSL na forma total (A), e fosforilada (B) e da Perilipina A (C)**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFDVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; \$ vs GKHFD; & vs GKHFDVh. 1 símbolo  $p < 0,05$ ; 2 símbolos  $p < 0,01$ ; 3 símbolos  $p < 0,001$ .

Foi também avaliada a expressão de proteínas responsáveis pela síntese de ácidos gordos, tais como a ACC e a FAS, não se tendo verificado alterações significativas da forma total da ACC. Os animais tratados com bromocriptina apresentaram uma diminuição dos níveis de ACC fosforilada (forma inativa) em relação aos grupos (*Wistar*  $p<0,05$ ) e GKHFD ( $p<0,01$ ) (figura 14B). Observou-se ainda uma diminuição dos níveis da FAS no grupo GKHFDBr, o que é contraditório com a menor inativação da ACC neste grupo (figura 14C).



**Figura 14: Análise por Western *Blotting* das proteínas ACC na forma total (A) e fosforilada (B) e da FAS (C)**

W- Wistar com dieta standard, 6 meses de idade; GK – Goto-kakizaki com dieta standard, 6 meses de idade; GKHFD – GK com dieta enriquecida em gordura e sacarose (1-6 meses de idade); GKHFDBr – GKHFD submetidos a administração de Bromocriptina, 30 dias (5-6 meses); GKHFVh – GKHFD submetidos a administração de solução veículo, 30 dias (5-6 meses). \* vs Wistar; # vs GK; \$ vs GKHFD; & vs GKHFVh. 1 símbolo  $p<0,05$ ; 2 símbolos  $p<0,01$ ; 3 símbolos  $p<0,001$ .



## Discussão

A diabetes *mellitus* tipo 2 é uma patologia que tem vindo a tomar proporções à escala global, sendo atualmente considerada como uma das maiores causas de mortalidade e morbidade. Esta doença é impulsionada por fatores genéticos e ambientais, como a obesidade que poderão desempenhar um papel preponderante no desenvolvimento da insulino-resistência e alterações nas células  $\beta$  pancreáticas (Emanuel et al., 2017; Nègre-salvayre et al., 2009; Shah & Brownlee, 2016). A insulino-resistência, por sua vez, está associada à deposição excessiva de ácidos gordos na sua forma não esterificada. A consequente ativação de vias inflamatórias impede a fosforilação e ativação do recetor de insulina, a metabolização de glicose pelo adipócito e o armazenamento dos ácidos gordos em triglicéridos. Estas alterações conduzem ao aumento dos níveis plasmáticos de FFA e da sua deposição ectópica em tecidos sensíveis à insulina (DeFronzo, 2011; Paulo Matafome et al., 2015; Nash, 2016). A bromocriptina, um agonista dopaminérgico D2, utilizado durante longos anos no tratamento do Parkinson e de prolactinomas, foi recentemente aprovado pela FDA como um fármaco apto a controlar os efeitos induzidos pela DM2, em complemento com uma dieta saudável e exercício físico (Kalra et al., 2011; Lopez Vicchi et al., 2016; Mikhail, 2011; Shivaprasad & Kalra, 2011). Este trabalho procurou avaliar o efeito da bromocriptina sobre as vias de armazenamento e metabolismo lipídico do tecido adiposo, bem como a sua relação com a melhoria do perfil glicémico e da sensibilidade à insulina.

Apesar de algumas células neuronais e macrófagos parecerem estar envolvidos na produção de catecolaminas, (Vargovic et al., 2011) demonstraram, pela primeira vez, que existe a síntese de catecolaminas endógena por parte do tecido adiposo. Esse estudo foi executado com recurso a um inibidor competitivo da TH, que impediu especificamente a síntese de dopamina e norepinefrina nos adipócitos. Assim, este estudo sugeriu que, mesmo em condições basais, quando a atividade do sistema adrenal simpático é menor, as

catecolaminas produzidas localmente possam afetar a mobilização lipídica nos adipócitos (Vargovic et al., 2011). Neste contexto, o nosso objetivo foi avaliar o potencial terapêutico da bromocriptina na modulação da função metabólica do tecido adiposo periepididimal, com o envolvimento da sinalização dopaminérgica e repercussões na insulino-resistência e no perfil glicêmico na diabetes *mellitus* tipo 2. A informação sobre os efeitos da bromocriptina nos mecanismos de consumo, armazenamento e síntese da glicose e dos ácidos gordos no tecido adiposo são ainda pouco conhecidos. Estudos anteriores demonstraram que indivíduos obesos com DMT2 aos quais foi administrada bromocriptina não apresentaram diferenças na perda de peso corporal em relação ao placebo (Gaziano et al., 2010; Pijl H. et al, 2000). Os nossos resultados comprovam estas observações, no sentido em que, mesmo tendo-se observado uma diminuição das calorias ingeridas após tratamento com bromocriptina, não se verificaram alterações significativas no peso corporal.

Neste estudo observámos ainda que a bromocriptina melhora a sensibilidade à insulina, por melhoria da área sob a curva e dos valores da glicemia às 2 horas durante a prova de tolerância à insulina, mas também pela melhoria do HOMA e da glicemia após jejum de 6 horas. Estes resultados são indícios de uma maior captação de glicose pelos tecidos periféricos nos animais aos quais foi administrada a bromocriptina, o que está de acordo com os estudos anteriores (Mikhail, 2011; Pijl H. et al, 2000; Schwartz & Zangeneh, 2016). Em particular, em estudos anteriores em indivíduos com DMT2, sujeitos a 16 semanas de tratamento com bromocriptina, foi possível identificar uma diminuição da glicemia plasmática em jejum e na prova oral de tolerância à glicose, em comparação com um aumento no grupo placebo. Estes dados sugerem que a bromocriptina promove um aumento da tolerância à glicose (Pijl H. et al, 2000). No estudo de (J. E. d. L. van Weenen et al., 2010) foi demonstrado que a bromocriptina diminui a secreção de insulina nas células  $\beta$ . Embora este mecanismo possa estar envolvido na alteração da resposta à glicose, os efeitos da bromocriptina na captação da mesma pelas células do tecido adiposo, fígado e músculo esquelético são desconhecidos. Ainda assim, é

importante referir o seu papel protetor na secreção de insulina nas células  $\beta$  do pâncreas (Lopez Vicchi et al., 2016; Schwartz & Zangeneh, 2016). Este efeito no pâncreas pode advir da regulação simpática, mas também da regulação neuronal do núcleo supraquiasmático com o hipotálamo ventromedial, pelo que é possível que as catecolaminas periféricas neste tecido tenham uma regulação mediada pelo hipotálamo (Lopez Vicchi et al., 2016).

Outros estudos descreveram a bromocriptina como um fármaco capaz de promover uma melhoria dos níveis de triglicéridos e dos FFA, pela diminuição da sua síntese no fígado e da sua mobilização a partir do tecido adiposo (Scranton & Cincotta, 2010). Este fato é comprovado pelos resultados obtidos dos animais tratados com bromocriptina em comparação com os seus controlos diabéticos obesos, pela diminuição dos níveis de triglicéridos. Estes efeitos, apesar de não serem visíveis através do peso dos animais, são concordantes com a diminuição da ração ingerida, das calorias associadas, assim como os valores obtidos pela pesagem do tecido adiposo periepidual, o que pode sugerir alterações na mobilização dos lípidos. Estes efeitos apresentam algumas limitações, nomeadamente no grupo veículo, por apresentar diminuição da ração ingerida e das calorias associadas. Ainda assim o grupo veículo não apresentou quaisquer alterações do perfil lipídico ou glicémico.

Uma vez que a bromocriptina é um agonista D2 dopaminérgico, fomos avaliar a sinalização dopaminérgica no tecido adiposo periepidual pelo estudo da enzima tirosina hidroxilase e dos recetores D1 e D2 da dopamina. Verificamos um aumento da sua expressão nos animais tratados com bromocriptina, sem alterações na expressão do recetor adrenérgico  $\beta_3$ . Desta forma, demonstramos que existem alterações da sinalização dopaminérgica no tecido adiposo e que a expressão da maquinaria de síntese e dos recetores da dopamina estão aumentados no grupo de animais administrados com bromocriptina, possivelmente com consequências para a função metabólica do adipócito, devido à sua ligação à síntese de AMP cíclico. Não são, ainda assim, de excluir os possíveis efeitos centrais da bromocriptina, podendo as alterações no tecido adiposo ser reflexo dessas ações.

Foi avaliada a via de sinalização da insulina no tecido, não se tendo observado alterações significativas da expressão e ativação do recetor da insulina nos diferentes grupos. Contudo, é visível um aumento do GLUT4, um transportador de glucose dependente da insulina, indicando um aumento da captação de glicose. Uma vez que estes estudos foram realizados em tecidos de animais sacrificados após jejum *overnight* é, no entanto, possível que essa possa ser a razão para a ausência de alterações no recetor da insulina nos animais tratados com bromocriptina e que resultados diferentes se poderiam obter no período pós-prandial. Ainda assim, o GLUT4 é também regulado pela enzima AMPK, podendo esta constituir uma via de ativação do transportador independente do recetor da insulina (Daval, Foufelle, & Ferré, 2006; Huang & Czech, 2007).

A lipólise é estimulada em períodos de jejum, sendo fortemente inibida pela insulina no período pós-prandial. Fomos avaliar os marcadores implicados na oxidação e síntese lipídica, devido à sua conhecida regulação pela insulina e, possivelmente, pela bromocriptina. Os estudos existentes mencionam a bromocriptina como um fármaco capaz de modular os depósitos de gordura pela modulação da lipólise e da lipogénese, reduzindo a acumulação de lípidos (Kalra et al., 2011; Lopez Vicchi et al., 2016). Neste estudo verificámos uma maior ativação da AMPK no grupo tratado com o fármaco, tendo revertido a diminuição observada nos ratos diabéticos e diabéticos mantidos com dieta rica em gorduras. Esta proteína encontra-se diminuída na obesidade e na insulino-resistência (Lindholm et al., 2012; Ruderman, Carling, Prentki, & Cacicedo, 2013), e quando ativa fosforila e inibe diretamente a atividade da ACC, uma enzima envolvida na síntese de malonil-CoA a partir da acetil-CoA, bem como a expressão da FAS (Bijland et al., 2013). Assim, seria esperada uma inibição da ACC, divergindo o Acetil-CoA para o ciclo de Krebs, em vez da lipogénese. No entanto, verifica-se uma diminuição da forma inativa (fosforilada) desta enzima. Paradoxalmente, a bromocriptina levou também à diminuição dos níveis da FAS, sugerindo uma inibição da lipogénese. Em relação à regulação da lipólise, verificou-se uma menor ativação (fosforilação) da HSL em jejum

após tratamento com bromocriptina, o que sugere menor lipólise. Assim, estes dados aparentemente contraditórios levantam novas questões sobre o papel da sinalização dopaminérgica *in vivo* no tecido adiposo e, particularmente, da bromocriptina no que respeita aos seus efeitos na síntese e armazenamento dos ácidos gordos. Mais ainda, a ausência de literatura nesta área e, em particular, na regulação destes mecanismos ao nível do tecido adiposo, torna difícil compreender os resultados obtidos. São, assim, necessários mais estudos, no sentido de compreender os mecanismos envolvidos, bem como desvendar o papel da sinalização dopaminérgica e da própria secreção de catecolaminas pelo tecido adiposo. É ainda importante, discernir os efeitos centrais da bromocriptina dos seus possíveis efeitos periféricos, no sentido de compreender os mecanismos pelos quais se observa uma melhoria do perfil glicémico e da sensibilidade à insulina.





## Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a bromocriptina induz uma melhoria do perfil glicêmico e da sensibilidade periférica à insulina. Foi ainda observada uma diminuição da ração ingerida e do peso do tecido adiposo periepididimal, sem que se tenham verificado alterações do peso corporal, sugerindo alterações da mobilização dos lípidos. Estas evidências são suportadas pelas alterações das vias de oxidação, síntese e armazenamento dos lípidos no adipócito após tratamento com o fármaco.

A bromocriptina levou a um aumento dos recetores dopaminérgicos no tecido adiposo, bem como ao aumento da expressão da enzima-chave da via biossintética da dopamina, sugerindo que a bromocriptina pode ter efeitos diretos no tecido adiposo.

Estes resultados sugerem que a bromocriptina melhora o perfil metabólico do tecido adiposo, com efeitos benéficos na sensibilidade à insulina e melhora o perfil global de diabetes *mellitus* tipo 2. Contudo, os mecanismos subjacentes às alterações do metabolismo lipídico são ainda desconhecidos, pelo que são necessários estudos futuros que permitam identificar os mecanismos centrais ou periféricos pelos quais a bromocriptina parece regular o metabolismo dos ácidos gordos. Desta forma, poder-se-ão identificar alvos terapêuticos que permitam modular a sinalização da dopamina e a sensibilidade à insulina na diabetes tipo 2.

## **Capítulo VII: Referências bibliográficas**

## Referências Bibliográficas

- Arner, P., & Langin, D. (2014). Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(5), 255–262.
- Baik, J. H. (2013). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, 1–16.
- Bartness, T. J., Shrestha, Y. B., Vaughan, C. H., Schwartz, G. J., & Song, C. K. (2010). Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 318, 34–43.
- Bastaki, S. (2005). Diabetes mellitus and its treatment. *Int J Diabetes & Metabolism*, 13, 111–134.
- Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182–217.
- Bijland, S., Mancini, S. J., & Salt, I. P. (2013). Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clinical Science*, 124, 491–507.
- Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., ... Bat, M. (2012). A PGC1 $\alpha$  - dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis.
- Boyda, H. N., Procyshyn, R. M., Pang, C. C. Y., & Barr, A. M. (2013). Peripheral adrenoceptors: The impetus behind glucose dysregulation and insulin resistance. *Journal of Neuroendocrinology*, 25, 217–228.
- Chambel, P., Marcelino, M., Domingues, A., Vilar, H., Lopes, L., Paradinha, M., ... de Castro, J. J. (2011). Caracterização de doentes com diabetes mellitus tipo 2 medicados com vildagliptina. *Acta Médica Portuguesa*, 24(4), 555–560.
- Daval, M., Fougelle, F., & Ferré, P. (2006). Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *The Journal of Physiology*, 574(1), 55–62.
- DeFronzo, R. A. (2011). Bromocriptine: A sympatholytic, D2-dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 34(4), 789–794.
- Eickhoff, H., Louro, T., Matafome, P., Seica, R., & Castro e Sousa, F. (2014). Glucagon secretion after metabolic surgery in diabetic rodents. *Journal of Endocri*, 255–265.
- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 331–349.
- Emanuel, A. L., Meijer, R. I., Muskiet, M. H. A., van Raalte, D. H., Eringa, E. C., & Serné, E. H. (2017). Role of Insulin-Stimulated Adipose Tissue Perfusion in the Development of Whole-Body Insulin Resistance Highlights. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(3), 411–418.

- Estevinho, M. F., & Fortunato, J. M. S. (2003). Dopamina E Receptores. *Revista Portuguesa de Psicossomatica*, 5(1), 21–31.
- Gaziano, J. M., Cincotta, A. H., O'Connor, C. M., Ezrokhi, M., Ruddy, D., Ma, Z. J., & Scranton, R. E. (2010). Randomized Clinical Trial of Quick-Release Bromocriptine Among Patients With Type 2 Diabetes on Overall Safety and. *Diabetes Care*, 33(7), 1503–1508.
- Golan, D. E., Junior, A. H. T., Armstrong, E. J., & Armstrong, A. W. (2009). *Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia*.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Vishwajeet, P., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular ...*, 9(5), 367–377.
- Hirata, R. D. C., & Hirata, M. H. (2006). Farmacogenética do tratamento de diabetes mellitos. *Medicina*, 39(4), 554–561.
- Huang, S., & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237–
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*, 383, 1068–1083.
- Kalra, S., Kalra, B., Agrawal, N., & Kumar, S. (2011). Dopamine: The Forgotten Felon in Type 2 Diabetes. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 5, 61–65.
- Kumar, A. pathak, Kumar, P. S., & Janardan, S. (2012). Bromocriptine - A Novel Approach for Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(5), 151–155.
- Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Progress in Lipid Research Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research*, 48, 275–297.
- Lamos, E. M., Levitt, D. L., & Munir, K. M. (2016). A review of dopamine agonist therapy in type 2 diabetes and effects on cardio-metabolic parameters. *Primary Care Diabetes*, 10, 60–65.
- Lindholm, C. R., Ertel, R. L., Bauwens, J. D., Schmuck, E. G., Mulligan, J. D., & Saupe, K. W. (2012). A high-fat diet decreases AMPK activity in multiple tissues in the absence of hyperglycemia or systemic inflammation in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*.
- Lopez Vicchi, F., Luque, G. M., Brie, B., Nogueira, J. P., Garcia Tornadu, I., & Becu-Villalobos, D. (2016). Dopaminergic drugs in type 2 diabetes and glucose homeostasis. *Pharmacological Research*, 109, 74–80.
- Luo, L., & Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *Journal of Endocrinology*, 231(3), R77–R99.
- Matafome, P., Rodrigues, T., & Seíça, R. (2015). Glycation and Hypoxia : Two Key Factors for Adipose Tissue Dysfunction. *Current Medicinal Chemistry*, 22, 1–21.

- Matafome, P., Santos-Silva, D., Sena, C. M., & Seïça, R. (2013). Common mechanisms of dysfunctional adipose tissue and obesity-related cancers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 29, 285–295.
- Mikhail, N. (2011). Quick-release bromocriptine for treatment of type 2 diabetes. *Current Drug Delivery*, 8, 511–516.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., & Langin, D. (2015). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*.
- Moura, V., & Monteiro, R. (2010). Papel do tecido adiposo na inflamação e metabolismo do doente obeso. *Revista de Alimentacao Humana*, 16(1), 15–22.
- Muoio, D. M., & Newgard, C. B. (2008). Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 193–205.
- Nash, A. I. (2016). Crosstalk between insulin and dopamine signaling: A basis for the metabolic effects of antipsychotic drugs. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 1–10. Retrieved from
- Nègre-salvayre, A., Augé, N., Pamplona, R., Portero-otin, M., Negre-salvayre, A., Salvayre, R., ... Portero-oti, M. (2009). Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 3071–3109.
- Ozougwu, J., Obimba, K., Belonwu, C., & Unakalamba, C. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology*, 4(4), 46–57.
- Piero, M. N., Nzaro, G. M., & Njagi, J. M. (2015). Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder, 4(40), 1–7.
- Pijl H. et al. (2000). A novel approach to the treatment of type 2 diabetes. *Emerging Treatments and Technologies*, 23(8).
- Raajendiran, A., Tsiloulis, T., & Watt, M. J. (2016). Adipose tissue development and the molecular regulation of lipid metabolism. *Essays In Biochemistry*, 80, 437–450.
- Rang, H., Dale, M., Ritter, M., Flower, R., & Henderson, G. . (2012). *Rang and Dale's Pharmacology seventh edition. Rang and Dale's Pharmacology*.
- Ravnskjaer, K., Madiraju, A., & Montminy, M. (2015). Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism. *Experimental Pharmacology*.
- Ribeiro, G., & Santos, O. (2013). , Diabetes e Metabolismo Recompensa alimentar : mecanismos envolvidos e implicac , ões para a obesidade. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes E Metabolismo*, 8(2), 82–88.
- Rodrigues, T., Matafome, P., & Seïça, R. (2013). A vascular piece in the puzzle of adipose tissue dysfunction : mechanisms and consequences, 3455, 1–11.

- Rodrigues, T., Matafome, P., & Seíça, R. (2013). Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 119(5), 209–18.
- Rosas-Hernandez, H., Ramirez, M., Ramirez-Lee, M. A., Ali, S. F., & Gonzalez, C. (2015). Inhibition of prolactin with bromocriptine for 28days increases blood-brain barrier permeability in the rat. *Neuroscience*, 301, 61–70.
- Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M., & Cacicedo, J. M. (2013). Science in medicine AMPK , insulin resistance , and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2764–2772.
- Saini, V. (2010). Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 1(3), 68–75.
- Schwartz, S. S., & Zangeneh, F. (2016). Evidence-based practice use of quick-release bromocriptine across the natural history of type 2 diabetes mellitus. *Postgraduate Medicine*, 128(8), 828–838.
- Scranton, R., & Cincotta, A. (2010). Bromocriptine--unique formulation of a dopamine agonist for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(2), 269–279.
- Shah, M. S., & Brownlee, M. (2016). Molecular and cellular mechanisms of cardiovascular disorders in diabetes. *Circulation Research*, 118(11), 1808–1829.
- Shivaprasad, C., & Kalra, S. (2011). Bromocriptine in type 2 diabetes mellitus. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15, 17–24.
- Siddiqui, A. A., Siddiqui, S. A., Ahmad, S., Siddiqui, S., Ahsan, I., & Sahu, K. (2013). Diabetes: Mechanism, pathophysiology and management-A review. *International Journal of Drug Development and Research*, 5(2), 1–23.
- Stefánsson, E., & Einarsdóttir, A. B. (2015). Public health and prevention of blindness in diabetes. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 3, 1–3.
- Tahrani, A. A., Bailey, C. J., Del Prato, S., & Barnett, A. H. (2011). Management of type 2 diabetes: New and future developments in treatment. *The Lancet*, 378, 182–197.
- Uva, M. S., Victorino, P., Roquette, R., Machado, A., & Dias, C. M. (2015). *Revista Portuguesa de*, 33.
- Vargovic, P., Ukropec, J., Laukova, M., Cleary, S., Manz, B., Pacak, K., & Kvetnansky, R. (2011). Adipocytes as a new source of catecholamine production. *FEBS Letters*, 585, 2279–2284.
- Watt, M. J., & Steinberg, G. R. (2008). Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *The Biochemical Journal*, 414, 313–25.
- Weenen, J. E. d. L. van, Parlevliet, E. T., Maechler, P., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Ouwens, D. M., ... Guigas, B. (2010). The dopamine receptor D2 agonist bromocriptine inhibits glucose-stimulated insulin secretion by direct activation of the  $\alpha$ 2-adrenergic receptors in beta cells. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1827–1836.

- Weenen, J. E. D. L. Van, Parlevliet, E. T., Schroder-Van Der Elst, J. P., Van Den Berg, S. A., Dijk, K. W. Van, Romijn, J. A., & Pijl, H. (2011). Pharmacological modulation of dopamine receptor D2-mediated transmission alters the metabolic phenotype of diet induced obese and diet resistant C57Bl6 mice. *Experimental Diabetes Research*, 1–10.
- Wharton, S. (2015). Current Perspectives on Long-term Pharmacotherapy for Obesity. *Canadian Journal of Diabetes*, 1–8.