

Adriana Oliveira Catarino Leandro

CROSSTALK ENTRE O TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR E OS VASOS SANGUÍNEOS NA DIABETES

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

orientada pela Professora Doutora Cristina Sena e co-orientada pelo Professor Doutor Paulo Santos

Julho 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

CROSSTALK ENTRE O TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR E OS VASOS SANGUÍNEOS NA DIABETES

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Sena (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e co-orientação do Professor Doutor Paulo Santos (Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra).

Adriana Oliveira Catarino Leandro
2017

Agradecimentos

No final desta etapa não posso deixar de agradecer às entidades financiadoras do projeto - FCT (PTDC/BIM-MET/4447/2014) e COMPETE (POCI-01-0145-FEDER-016784) -, assim como a todas as pessoas que me acompanharam ao longo deste último ano e que, de alguma forma, contribuíram para a realização e enriquecimento do trabalho aqui apresentado.

À professora Doutora Cristina Sena, orientadora de mestrado, por me ter permitido integrar este projeto. E pelo seu apoio, consideração e ajuda prestada, que contribuiu para a minha evolução durante o presente ano.

Ao orientador interno, professor Doutor Paulo Santos, pela sua amabilidade e pela disponibilidade demonstrada sempre que algo lhe era solicitado.

À Lara, colega de mestrado, e às mestres Ana Raquel e Margarida, pela partilha de inúmeros ensinamentos e experiência laboratorial. Obrigada pela amizade, companheirismo e por todos os bons momentos passados em modo “Quarteto Fantástico”.

Agradeço também ao restante pessoal do laboratório pela boa disposição e por se mostrarem sempre disponíveis para auxiliar no que era necessário.

Por fim, deixo um agradecimento a todos os meus amigos e familiares, que sempre estiveram lá quando necessitei, em particular, às amigas de uma vida, Cátia e Diana. Também à minha madrinha que sempre fez questão de me acompanhar e me apoiar, tanto a nível pessoal, como académico.

Aos meus pais por todo o apoio. Em especial, à minha mãe, e ainda aos meus irmãos, por estarem sempre presentes e me ajudarem a ultrapassar os constantes desafios do dia-a-dia. Sem vocês, nada teria sido possível, por isso dedico-vos este meu percurso!

A todos o meu sincero obrigada!

Adriana Oliveira Catarino Leandro

Cofinanciado por:



Índice Geral

Agradecimentos	I
Índice de Figuras.....	IV
Índice de Tabelas.....	V
Lista de Abreviaturas e Acrónimos.....	VI
Resumo	VIII
<i>Abstract</i>	IX
I. Introdução.....	1
1. Síndrome metabólica.....	2
2. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	2
3. Obesidade	3
3.1. Tecido Adiposo.....	4
3.1.1. Adipocinas	6
3.1.2. Tecido adiposo perivascular	8
4. Doença Vascular	11
4.1. Endotélio.....	11
4.1.1. Disfunção endotelial.....	12
4.1.1.1. Mecanismos de disfunção endotelial	13
II. Objetivos.....	15
III. Materiais e Métodos	17
1. Reagentes e produtos	18
2. Materiais.....	19
3. Modelos animais.....	19
4. Monitorização dos animais e análises <i>in vivo</i>	21
5. Sacrifício e processamento de amostras.....	21

6. Estudos Funcionais	22
7. Determinação de frutossamina.....	25
8. Análise estatística.....	25
IV. Resultados.....	26
1. Peso corporal e índice de obesidade	27
2. Perfil lipídico	28
3. Perfil glicêmico	29
3.1. Glicemia.....	29
3.2. Frutossamina.....	30
4. Metabolismo da glicose	31
4.1. Prova de tolerância à glicose.....	31
4.2. Prova de tolerância à insulina.....	32
5. Função endotelial	34
5.1. Efeito do PVAT na função endotelial	34
5.2. Efeito da omentina na função endotelial.....	36
5.3. Efeito de L-NAME e indometacina e o relaxamento independente do endotélio	38
V. Discussão	41
VI. Conclusão.....	48
VII. Referências bibliográficas.....	51

Índice de Figuras

Figura 1 - Diagrama com o mecanismo do surgimento de resistência sistêmica à insulina em indivíduos com obesidade, por alteração da secreção de adipocinas.....	6
Figura 2 - Funções da omentina-1 no endotélio e musculatura lisa.	8
Figura 3 - Influência do PVAT na função vascular.	10
Figura 4 - Propriedades vaso-protetoras do monóxido de azoto.....	12
Figura 5 - Resistência à insulina induzida pela disfunção do tecido adiposo.	14
Figura 6 - Representação esquemática dos grupos de animais e cronologia dos respectivos tratamentos.	20
Figura 7 - Representação esquemática da montagem dos anéis de artéria ou de artéria com tecido perivascular nas câmaras do miógrafo.	23
Figura 8 - Valores de glicemia registados no início e no final dos tratamentos.....	30
Figura 9 - Níveis plasmáticos de frutossamina (FRA) determinados no final do estudo.	30
Figura 10 - Prova de tolerância intraperitoneal à glicose realizada no início do estudo.....	31
Figura 11 - Prova de tolerância intraperitoneal à glicose realizada no final do estudo.....	32
Figura 12 - Prova de tolerância intraperitoneal à insulina realizada no final do estudo.....	33
Figura 13 - Prova de tolerância intraperitoneal à insulina realizada no final do estudo.....	34
Figura 14 - Curva dose-resposta à acetilcolina (ACh).....	35
Figura 15 - Curva dose-resposta à endotelina-1 (ET-1).....	36
Figura 16 - Curva dose-resposta à acetilcolina (ACh).....	37
Figura 17 - Curva dose-resposta à acetilcolina (ACh).....	38
Figura 18 - Curva dose-resposta à acetilcolina (ACh) na presença de L-NAME.....	39
Figura 19 - Curva dose-resposta à acetilcolina (ACh) na presença de L-NAME e indometacina.	39
Figura 20 - Curva dose-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP).	40

Índice de Tabelas

Tabela 1 - A síndrome metabólica pode ser diagnosticada, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes, pela presença de 3 ou mais dos seguintes critérios:	2
Tabela 2 - Mecanismos de disfunção do PVAT.....	10
Tabela 3 - Reagentes e outros produtos utilizados durante o trabalho.	18
Tabela 5 - Materiais necessários à realização do trabalho.	19
Tabela 4 - Composição das dietas utilizadas no trabalho.	20
Tabela 6 - Sequência de adições de acetilcolina (ACh), e concentração desta mesma substância na câmara, durante um ensaio de dose-resposta.	24
Tabela 7 - Sequência de adições de endotelina-1 (ET-1), e concentração desta mesma substância na câmara, durante um ensaio de dose-resposta.	24
Tabela 8 - Sequência de adições de nitroprussiato de sódio (SNP), e concentração desta mesma substância na câmara, durante um ensaio de dose-resposta.	25
Tabela 9 - Peso corporal dos animais no final do estudo.	27
Tabela 10 - Índice de Lee antes do tratamento com omentina e no final do estudo.	28
Tabela 11 - Níveis circulantes de colesterol total e de triglicérides no final do estudo.	29

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

ACh	Acetilcolina
AGE	Produto Final de Glicação Avançada
AUC	Área Abaixo da Curva
BAT	Tecido Adiposo Castanho
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
C₆H₁₂O₆	Glicose
CO₂	Dióxido de Carbono
COX	Cicloxigenase
CRTP	<i>C1q/TNF-Related Protein</i>
DCV	Doenças Cardiovasculares
DAG	Diacilglicerol
EDHF	Fator Hiperpolarizante Dependente do Endotélio
eNOS	Sintase de Monóxido de Azoto Endotelial
e.p.m.	Erro Padrão da Média
ET-1	Endotelina-1
FFA	Ácidos Gordos Livres
FRA	Frutosamina
GK	Goto-Kakizaki
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HFD	Dieta Rica em Gorduras
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
iNOS	Sintase de Monóxido de Azoto Indutível
KCl	Cloreto de Potássio

KH₂PO₄	Fosfato Monopotássio
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
L-NAME	N ω Nitro-L-Arginina Metil Ester
MAPK	Proteínas Cinases Ativadas por Mitogénios
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MgSO₄	Sulfato de Magnésio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NO	Monóxido de Azoto
O₂	Oxigénio
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogénio
PGI₂	Prostaciclina 2
Phe	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Cinase
PTG	Prova de Tolerância à Glicose
PTI	Prova de Tolerância à Insulina
PVAT	Tecido Adiposo Perivascular
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SNP	Nitroprussiato de Sódio
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VSCM	Células da Musculatura Lisa Vascular
W	Wistar
WAT	Tecido Adiposo Branco

Resumo

A diabetes *mellitus* tipo 2 e a obesidade têm vindo a aumentar a sua prevalência a nível mundial, sendo referidas como epidemias do atual século. Ambas se encontram estreitamente associadas, uma vez que o excesso de gordura visceral e consequente disfunção do tecido adiposo, pode causar o desenvolvimento de resistência à insulina. O tecido adiposo é um tecido complexo, heterogéneo e com elevada plasticidade fenotípica, produtor de diversas moléculas sinalizadoras – as adipocinas –, e que se encontra distribuído por todo o organismo, podendo ser encontrado em grandes depósitos ou em localizações mais restritas, como é o caso do tecido adiposo perivascular (PVAT). Devido à sua localização, o PVAT poderá influenciar localmente o funcionamento dos vasos sanguíneos e ser responsável por, em condições patológicas, levar às complicações vasculares associadas à diabetes e à obesidade. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar o impacto do PVAT na função endotelial, num modelo animal de diabetes *mellitus* tipo 2 não obeso, ratos Goto-Kakizaki (GK), com a introdução de uma ração rica em gorduras de forma a simular os erros alimentares muitas vezes cometidos nos dias que correm. Além disso, pretende-se ainda investigar o efeito da administração de uma adipocina, a omentina-1, nestas condições fisiopatológicas. Foram então avaliados alguns biomarcadores metabólicos e efetuada a caracterização funcional da artéria aorta nos diferentes grupos de animais. Demonstrou-se que a ação anti-contrátil do PVAT verificada em condições fisiológicas é perdida na diabetes tipo 2, e parcialmente recuperada com a administração de omentina. Além disso, foi observada uma melhoria de vários parâmetros bioquímicos sistémicos e metabólicos dos animais diabéticos tratados durante um mês com a omentina, nomeadamente os níveis circulantes de triglicéridos, a glicemia em jejum e a tolerância à insulina. Com este trabalho concluiu-se que, apesar de serem necessários outros estudos complementares, a omentina apresenta um potencial terapêutico na diabetes tipo 2.

Palavras-chave: diabetes, obesidade, disfunção endotelial, tecido adiposo perivascular, omentina-1

Abstract

Type 2 diabetes and obesity have been increasing their prevalence worldwide, being referred as epidemics of the current century. Both are closely associated, since the visceral fat excess and consequent adipose tissue dysfunction, may cause insulin resistance development. Adipose tissue is a complex, heterogenous tissue with high phenotypic plasticity, which produces several signaling molecules – adipokines –, and that is distributed throughout the body, it can be found in large deposits or in more restricted locations, such as perivascular adipose tissue (PVAT). Because of its location, PVAT may locally influence the functioning of blood vessels and be responsible for lead, in pathological conditions, to the vascular complications associated with diabetes and obesity. Thus, the aim of this work was to study the impact of PVAT on endothelial function in a non-obese type 2 diabetes mellitus animal model, Goto-Kakizaki (GK) rats, with the introduction of a high fat diet to simulate dietary errors often committed nowadays. In addition, it was also intended to investigate the effect of an adipokine administration, omentin-1, in these pathophysiological conditions. Some metabolic biomarkers were then evaluated and the functional characterization of the aortic artery was performed in the different groups of animals. It was shown that the PVAT anti-contractile action found under physiological conditions is lost in type 2 diabetes, and partially recovered with omentin administration. Furthermore, it was observed an improvement in various systemic and metabolic biochemical parameters of diabetic animals treated for one month with omentin, namely circulating triglyceride levels, fasting glycaemia and insulin tolerance. With this work we concluded that, although other complementary studies are needed, omentin presents a therapeutic potential in type 2 diabetes.

Keywords: diabetes, obesity, endothelial dysfunction, perivascular adipose tissue, omentin-1

I. Introdução

1. Síndrome metabólica

A síndrome metabólica afeta cerca de 1/3 da população adulta portuguesa, e o seu diagnóstico pode ser realizado por avaliação de alguns parâmetros bioquímicos e clínicos, que se apresentam na Tabela 1, como a glicemia em jejum, o nível de triglicéridos e de colesterol HDL, a pressão arterial e o perímetro abdominal.

Esta síndrome designa o conjunto de múltiplos fatores de risco, tanto para doenças cardiovasculares, como para diabetes *mellitus* tipo 2, tendo como causas a obesidade central e a insulino-resistência^{1,2}. Deste modo, sendo a obesidade o principal fator de risco para a ocorrência da diabetes tipo 2, não é surpreendente que os padrões mundiais de prevalência destas duas fisiopatologias se sobreponham³.

Tabela 1- A síndrome metabólica pode ser diagnosticada, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes, pela presença de 3 ou mais dos seguintes critérios:

Perímetro da cintura	> 94 cm (homem) e > 80 cm (mulher)
Triglicéridos plasmáticos	≥ 150 mg·dL ⁻¹
Pressão arterial	≥ 130/85 mmHg
Colesterol HDL	< 40 mg·dL ⁻¹ (homem) e < 50 mg·dL ⁻¹ (mulher)
Glicemia	≥ 100 mg·dL ⁻¹

2. Diabetes *mellitus* tipo 2

A diabetes é uma doença metabólica crónica que, segundo a Federação Internacional de Diabetes, em 2015, afetava 8,8% da população global (415 milhões de pessoas) e estima-se que, em 2040, estes números aumentem para 10,4% e 642, respetivamente⁴.

A forma mais prevalente desta patologia é a diabetes *mellitus* tipo 2, que se caracteriza por uma hiperglicemia proporcionada pela resistência à hormona insulina, sendo definida por uma desregulação na razão glicose-insulina⁴. Nestas condições, a capacidade da insulina estimular o *uptake* da glicose em tecidos periféricos (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo) encontra-se diminuída^{5,6}. Neste sentido, indivíduos diabéticos apresentam alterações no metabolismo da glicose ou na sua tolerância, bem como uma sobreprodução inicial de insulina

(hiperinsulinemia), um mecanismo compensatório face à insensibilidade a esta hormona^{1,7}, pelo que deverá ser a resistência à insulina um dos elos de ligação entre a obesidade e alterações vasculares, tais como a hipertensão^{5,8}.

A terapêutica clássica da diabetes tem como objetivo atingir a normoglicemia e a sua manutenção a longo prazo. No entanto, estando o risco de doença cardiovascular consideravelmente aumentado em indivíduos insulino-resistentes, estão a ser desenvolvidas novas estratégias que possam ser direcionadas aos dois alvos, diabetes e doença cardiovascular⁹.

3. Obesidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2014 mais de um em cada três adultos (39%) em todo o mundo tinha excesso de peso, e 11% dos homens e 15% das mulheres eram obesos, sendo que estes valores de prevalência global da obesidade mais do que duplicaram desde o ano de 1980. A obesidade é definida pela mesma organização como sendo a acumulação anormal ou excessiva de gordura corporal, de tal forma que a saúde do indivíduo passe a ser adversamente afetada.

Geralmente representativa de um estilo de vida desadequado (sedentarismo e dieta desequilibrada), esta patologia é mais prevalente em países de cultura ocidental e tende a ser um problema crescente em países em desenvolvimento¹⁰.

Caracterizada pelo aumento anómalo de tecido adiposo, esta é uma doença crónica, multifatorial, pois surge como resultado da interação entre o património genético de cada indivíduo e os fatores ambientais e comportamentos levados a cabo durante a sua vida. Embora a sua etiologia não seja facilmente determinada, sabe-se que em 95% dos casos, a origem da obesidade é exógena, ou seja, é decorrente de fatores comportamentais, dietéticos e ambientais, e, nos restantes 5%, a causa é endógena, estando relacionada com fatores genéticos, neuropsicológicos, endócrinos e metabólicos¹¹. Independentemente da preponderância de cada um destes fatores causais, o aumento da adiposidade acaba por estar maioritariamente relacionado com um desequilíbrio prolongado ou permanente entre a ingestão calórica e o gasto energético de cada indivíduo. Deste modo, a prevenção, ou até a primeira linha de tratamento

da obesidade, na maioria dos casos, passa pela realização de uma dieta saudável, associada à prática de atividade física¹².

A obesidade pode ser classificada como obesidade do tipo periférico, quando o aumento de tecido adiposo ocorre em regiões subcutâneas (maioritariamente nas ancas, glúteos e coxas) ou obesidade do tipo central (visceral), quando a gordura é acumulada na cavidade intra-abdominal, nos espaços entre os órgãos internos. De entre estas duas variantes, a obesidade central é a que está normalmente associada a piores prognósticos, em especial a um elevado risco de desenvolvimento de resistência periférica à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2, bem como hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares^{13,14,15}, e também poderá estar na origem de certos tipos de cancro¹⁶. Para além das complicações vasculares e da insulino-resistência adquirida, indivíduos com excesso de peso tendem a apresentar-se dislipidémicos, isto é, evidenciam alterações nos níveis de lípidos e/ou lipoproteínas plasmáticos. Estas perturbações incluem a redução do colesterol HDL e o incremento dos triglicéridos, colesterol LDL e VLDL, e ácidos gordos livres no plasma sanguíneo^{15,17}. Tendo-se verificado ainda que a perda de peso/gordura corporal, nomeadamente da gordura visceral, permite melhorar a função endotelial⁸.

Assim sendo, o tecido adiposo, significativamente aumentado e disfuncional em indivíduos com excesso de peso, estará provavelmente envolvido em algumas das comorbilidades associadas à obesidade, potencialmente encontradas num quadro de síndrome metabólica^{18,19}.

3.1. Tecido Adiposo

O tecido adiposo é bem vascularizado e innervado, heterogéneo, e composto maioritariamente por adipócitos, mas também por outros tipos celulares como pré-adipócitos, fibroblastos, células do sistema microvascular e do sistema imunitário²⁰.

Distinguem-se dois tipos de tecido adiposo, o castanho (BAT) e o branco (WAT), que apresentam diferenças histológicas e funcionais. O primeiro é constituído por adipócitos multiloculares, isto é, possuem mais do que um vacúolo (gotícula) onde é armazenada gordura sob a forma de triglicéridos, e são também ricos em mitocôndrias e em proteína desacopladora 1, sendo a sua principal função a oxidação de gorduras, com libertação de calor¹⁵. Esta

I. Introdução

capacidade de termogênese do BAT é bastante evidente em recém-nascidos, já que em adultos a quantidade deste tecido é mais reduzida²¹.

No que respeita ao WAT, os seus adipócitos são maiores e uniloculares, e desempenha funções como o armazenamento de triglicéridos, o isolamento térmico e a proteção dos órgãos internos^{15,21}. Sabe-se também que se trata de um tecido metabolicamente bastante ativo, onde são produzidas e libertadas diversas moléculas que vão atuar como modeladores de funções biológicas, tanto a longa distância, distribuindo-se sistemicamente, como a distâncias mais curtas, com ação autócrina ou parácrina¹⁹.

Consegue ter-se uma melhor perceção do papel do tecido adiposo na regulação e manutenção da homeostasia do organismo quando, num estado patológico de inflamação crónica de baixo grau, característico da obesidade e diabetes²², este se torna disfuncional e provoca inúmeras alterações fisiológicas. O tecido expande, os adipócitos sofrem hipertrofia, o número de células imunitárias aumenta²³, e ocorrem modificações no perfil secretor do tecido, nomeadamente produzindo-se maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6), a resistina, a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e o inibidor do ativador do plasminogénio (PAI-1)^{22,24}. Por sua vez, como já foi referido, também se verifica uma menor biodisponibilidade das adipocinas com ações benéficas²⁵. A desregulação na produção e secreção de adipocinas desencadeia um processo inflamatório, que potencia o desenvolvimento de resistência à insulina (Figura 1), diabetes *mellitus* tipo 2²⁰, e das complicações vasculares associadas à obesidade²⁵.

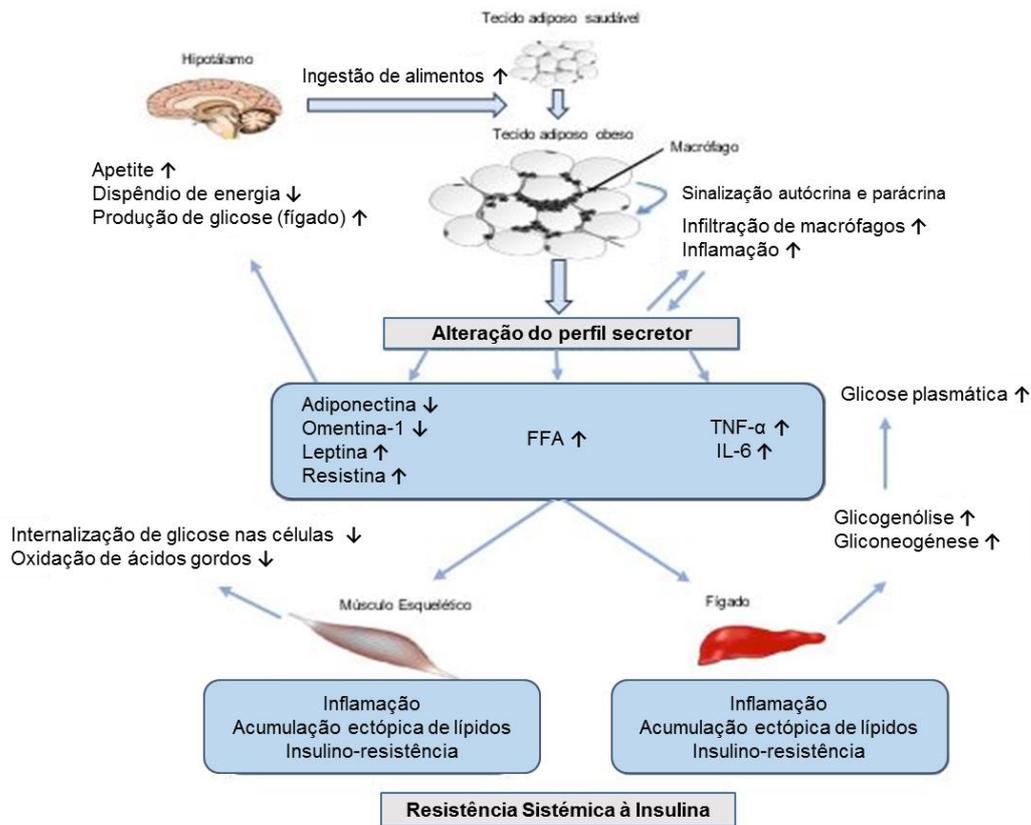


Figura 1 - Diagrama com o mecanismo do surgimento de resistência sistêmica à insulina em indivíduos com obesidade, por alteração da secreção de adipocinas (adaptado de Galic S. *et al.*, 2010).

3.1.1. Adipocinas

São várias as substâncias produzidas e libertadas pelo tecido adiposo, tanto pelos adipócitos como pela fração não adipocitária, e que vão influenciar a homeostasia do organismo, sendo coletivamente denominadas adipocinas^{22,25-27}.

As adipocinas são altamente diversificadas em termos de estrutura e função fisiológica²². Nelas incluem-se, para além das citocinas clássicas, fatores de crescimento e outras proteínas sistêmicas complementares²².

Dentro das adipocinas algumas parecem desempenhar um papel protetor relativamente ao organismo em geral e ao sistema vascular em particular, como é o caso da adiponectina, CTPR9 e omentina-1.

A adiponectina também designada ACRP30 é uma hormona proteica de 30 KDa, que pode ser libertada para a corrente sanguínea sob a forma de trímero, hexâmero e oligómero de alto peso molecular, e cada uma destas 3 formas é responsável por diferentes ações. Ao interagir com os seus recetores, esta adipocina pode ativar cascatas moleculares que vão influenciar a

I. Introdução

regulação do metabolismo celular (internalização de glicose, β -oxidação de ácidos gordos e biogénese mitocondrial)²⁸. Desempenha também ações anti-inflamatórias, anti-aterogénicas, antioxidantes e estimula a sensibilização celular face à insulina²⁹.

Porém, os níveis circulantes desta hormona são inversamente proporcionais à quantidade de massa gorda corporal, encontrando-se diminuídos em indivíduos com excesso de peso e também em diabéticos^{22,30}. Foi anteriormente descrito que a administração de adiponectina exógena tem efeitos protetores relativamente a células da vasculatura, sendo esta uma proteína capaz de reduzir biomarcadores sistémicos de inflamação. Adicionalmente, evidenciou-se um aumento da biodisponibilidade da substância vasodilatadora monóxido de azoto (NO), através da fosforilação (ativação) da enzima endotelial que produz este importante vasodilatador (eNOS)²⁹.

A CTRP9 é uma de várias proteínas pertencentes à família de CTRPs (*C1q/TNF-related proteins*) e, de entre todas, é a que exerce funções mais similares às da adiponectina, chegando inclusivamente a partilhar o mesmo recetor (AdipoR1), localizado em cardiomiócitos e em células do endotélio vascular, onde promove proteção cardiovascular²⁵. Tal como a adiponectina, a CTRP9 encontra-se diminuída na corrente sanguínea de obesos, e uma redução da mesma correlaciona-se com o estado de insulino-resistência²⁵.

A omentina-1, também denominada intelectina-1, desempenha inúmeras ações de proteção cardiovascular (Figura 2), tendo sido demonstrado que promove a vasodilatação e suprime respostas inflamatórias em células endoteliais, bem como a sobrevivência e a diferenciação destas células. Esta adipocina melhora a função endotelial através da fosforilação da eNOS^{25,31}.

Geralmente é detetada em concentrações de 100-800 ng·mL⁻¹ em amostras de sangue humano e, tal como as adipocinas acima descritas, a omentina-1 também apresenta os seus níveis sistémicos reduzidos em indivíduos com obesidade, intolerância à glicose e diabetes tipo 2³², tendo sido verificada, *in vitro*, a sua ação na estimulação do *uptake* de glicose em resposta à insulina^{33,34}.

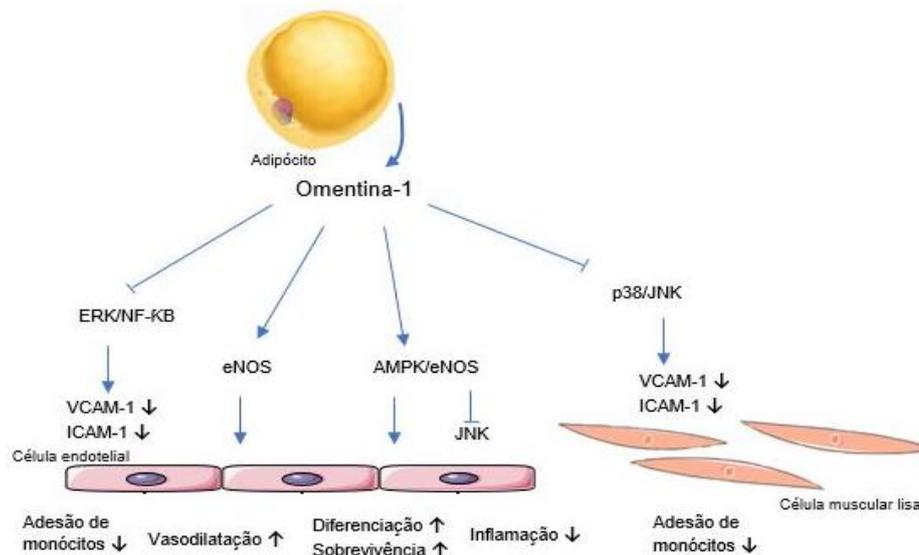


Figura 2 - Funções da omentina-1 no endotélio e musculatura lisa (adaptado de Ohashi, K. *et al.*, 2014).

3.1.2. Tecido adiposo perivascular

Para além do tecido adiposo subcutâneo e do tecido adiposo visceral, existe também o tecido adiposo perivascular (PVAT), isto é, o tecido adiposo que rodeia os vasos sanguíneos. Anatomicamente, o PVAT é contíguo à adventícia da parede do vaso³⁵ e, dependendo da localização e do calibre do vaso, pode ser muito abundante, como no caso da artéria aorta, ou praticamente inexistente, como na vasculatura cerebral e nos capilares sanguíneos^{21,36}. É também um tecido com elevada plasticidade e variabilidade fenotípica, sendo amplamente influenciado pela sua localização anatómica e vascular, apresentando variações entre adipócitos brancos, castanhos, e até os intermédios (beges)³⁷, como acontece ao longo da artéria aorta, onde, na porção torácica, as células que constituem o PVAT são idênticas às células de tecido adiposo castanho, porém, na aorta abdominal, este tecido é constituído por células cujas características se aproximam de adipócitos brancos, como os que constituem os grandes depósitos de gordura visceral. Destes, tanto o WAT como o PVAT de aorta abdominal apresentam uma maior expressão de genes inflamatórios e de marcadores de infiltração por células do sistema imunitário, comparativamente ao BAT e ao PVAT torácico, respetivamente³⁸.

Devido à sua localização privilegiada, no sentido em que se encontra em estreita associação com os vasos sanguíneos, o PVAT influencia localmente as funções vasculares, de fora para dentro dos vasos sanguíneos, através dos efeitos vasócrinos das várias adipocinas que

I. Introdução

segrega para o meio extracelular, tendo ação, inclusive, na camada mais interna da parede vascular, o endotélio^{39,40}.

Muitas das ações do PVAT nos vasos sanguíneos estão ainda por clarificar, no entanto, o facto de, num mesmo vaso sanguíneo, como é o caso da artéria aorta, existir maior propensão para o desenvolvimento de aterosclerose na região abdominal do que na porção torácica, e dado que esta artéria não apresenta diferenças quanto à sua constituição e, sendo as forças de cisalhamento e de hemodinâmica à partida similares, surge a hipótese de ser o PVAT a proporcionar esta distinta vulnerabilidade³⁸.

O PVAT liberta moléculas que estimulam, por exemplo, as células endoteliais a sintetizar NO, desencadeando uma ação anti-contrátil na vasculatura, uma vez que o NO é o principal vasodilatador que, após ser produzido pelo endotélio, difunde até às células da musculatura vascular lisa (VSCM) provocando o seu relaxamento³⁹. Porém, este tecido também é responsável pela libertação de substâncias vasoconstritoras, ou seja, fatores que vão inibir a produção e/ou diminuir a biodisponibilidade de NO^{40,41}.

Por outro lado, os adipócitos perivasculares são conhecidos secretores de moléculas anti-inflamatórias como a adiponectina e a omentina-1, tendo-se provado que, em obesos e diabéticos, quando o PVAT está modificado apresenta um carácter muito mais pro-inflamatório e pro-aterogénico^{29,42}, com redução dos níveis destas duas adipocinas benéficas^{25,40}. Estudos efetuados em roedores demonstraram haver um aumento de doença vascular em animais sujeitos à remoção do PVAT, sugerindo que este tecido é efetivamente essencial para a manutenção da homeostase vascular⁴¹.

Sabe-se que os adipócitos do PVAT se encontram num estado de menor diferenciação quando comparados com os adipócitos de depósitos viscerais e subcutâneos, e poderão apresentar um perfil secretor enriquecido em citocinas pró-inflamatórias (interleucinas 6 e 8, e MCP-1), contrariamente à secreção de adiponectina⁴³, o que contribui para a promoção de uma resposta inflamatória deste mesmo tecido que é observada em vasos sanguíneos ateroscleróticos^{36,38}. A inflamação que ocorre neste tecido pode ser modulada por vários fatores ambientais/comportamentais, como uma alimentação rica em gorduras ou o fumo do tabaco, que são relevantes em processos ateroscleróticos⁴³.

I. Introdução

Em determinadas condições, como na obesidade, ocorrem modificações estruturais e funcionais no PVAT (Tabela 2), que se admite poderem estar relacionadas com a disfunção endotelial e dano vascular (Figura 3)⁴⁴. Estando já descrito, tanto em modelos animais como em pacientes obesos, a existência de alterações na quantidade e padrão de expressão das adipocinas, havendo um desequilíbrio a favor das substâncias com ações vasoconstritoras e pró-inflamatórias^{39,42}.

Todos estes dados sugerem que o fenótipo inflamatório do PVAT é diversificado e depende da espécie em questão, da região anatômica e de fatores exógenos, e essas diferenças são fundamentais para a determinação de uma ação protetora ou prejudicial do PVAT na função vascular^{40,43}.

Tabela 2 - Mecanismos de disfunção do PVAT (adaptado de Fernández-Alfonso, M.S. *et al.*, 2013).

Hipertrofia dos adipócitos e aumento da quantidade de PVAT	Perda de propriedade anti-contrátil
Hipóxia	Redução da eNOS e de NO
Envelhecimento	Aumento do stress oxidativo
Desequilíbrio entre: Leptina / Adiponectina	Desenvolvimento e resposta inflamatória

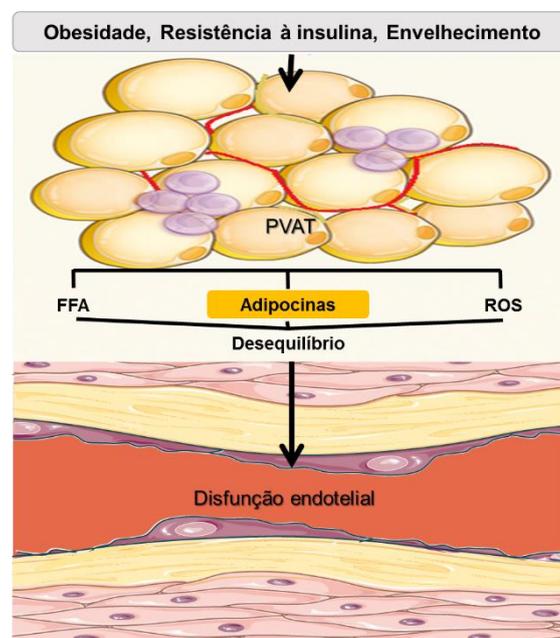


Figura 3 - Influência do PVAT na função vascular (adaptado de Miao C. *et al.*, 2012).

4. Doença Vascular

Uma atividade vascular normal é essencial para o bom funcionamento de todo o organismo. Quando isso não acontece, isto é, em caso de doença vascular, geralmente na sua gênese ocorre uma perda função da camada de células endoteliais⁴⁵, que está dependente de um balanço entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras derivadas do endotélio vascular. Desta forma, pode assumir-se a disfunção do endotélio como um estágio inicial do processo aterosclerótico⁴⁶.

Tendo em conta a elevada incidência de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV), uma maior atenção tem sido dada ao sistema vascular no sentido de compreender os mecanismos que podem contribuir para a associação das DCV a fatores como o *stress*, e a patologias como a diabetes e a obesidade⁴⁶.

4.1. Endotélio

O endotélio é a camada mais interna da parede dos diversos tipos de vasos sanguíneos, e a única que é comum a todos eles.

É constituído por apenas uma camada de células que delimita o lúmen dos vasos, sendo a primeira barreira seletiva entre o sangue e os restantes tecidos. Desempenha funções de extrema importância, tais como: o controlo da fluidez do sangue, a agregação plaquetária, o tónus vascular, e processos angiogénicos e inflamatórios⁴⁷.

Como consequência da regulação do tónus vascular, também o fluxo sanguíneo é controlado pelas células endoteliais que produzem e libertam fatores vasoativos que promovem o relaxamento, assim como a contração das células musculares lisas existentes nas paredes das artérias, levando, quer à vasodilatação, quer à vasoconstrição, respetivamente^{47,48}.

O NO é, como referido anteriormente, o principal fator vasodilatador produzido pelo endotélio vascular, a partir da ação da enzima sintase de monóxido de azoto (eNOS) aí presente, durante a oxidação de L-arginina a L-citrulina⁴⁵. O NO desempenha ações anti-aterogénicas (Figura 4) na parede arterial, incluindo efeitos antioxidantes por eliminação direta de superóxido,

a limitação das interações entre leucócitos e o endotélio, e diminuição da agregação plaquetária⁴⁹.

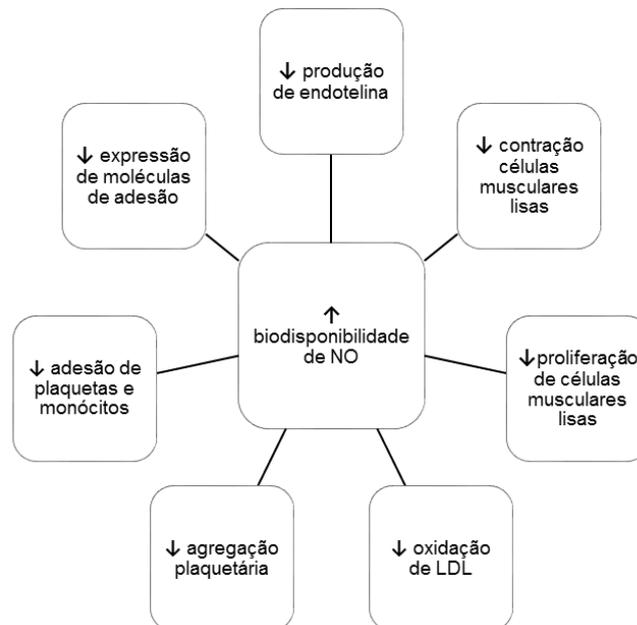


Figura 4 - Propriedades vaso-protetoras do monóxido de azoto.

Para além do NO, o endotélio produz outras substâncias vasodilatadoras, como a prostaciclina 2 (PGI₂) e o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), e também substâncias com ação constritora, como a endotelina-1 (ET-1), a angiotensina-II e espécies reativas de oxigénio (ROS). Produz ainda moléculas com ação pró-trombótica, como o fator de Willebrand e o PAI-1, tendo o NO e a PGI₂ também efeitos anti-trombóticos. Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre as diversas substâncias de modo a garantir a homeostase vascular⁴².

4.1.1. Disfunção endotelial

A principal característica da disfunção endotelial é o comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio, sendo também possível identificar mudanças nesta camada celular para um fenótipo pró-inflamatório e pró-trombótico⁵⁰. Além da redução de fatores vasodilatadores derivados desta camada celular, ocorre o aumento de vasoconstritores, a sobreprodução de

espécies reativas de oxigénio ou de nitrogénio e a ativação de respostas inflamatórias, são alguns mecanismos que podem contribuir para a perda de função da camada endotelial⁴⁸.

Esta ocorre, na maioria das vezes, associada a determinadas condições de risco como a diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, dislipidemia, tabagismo, envelhecimento e obesidade⁴⁶.

4.1.1.1. Mecanismos de disfunção endotelial

A hiperglicemia e a resistência à insulina verificadas em indivíduos diabéticos são dois dos mecanismos que explicam a ocorrência de complicações vasculares decorrentes da diabetes e também da obesidade.

A persistente elevada concentração de glicose no sangue é uma característica da diabetes e um dos principais fatores que contribui para as complicações vasculares a ela associadas.

Este estado de hiperglicemia crónica afeta particularmente as células endoteliais uma vez que, ao contrário de outros tipos celulares, estas não têm capacidade de controlar a permeabilidade à glicose⁵¹. Assim, o aumento da glicose intracelular promove reações de glicação, isto é, reações não enzimáticas, inespecíficas e permanentes de interação entre intermediários glicolíticos e macromoléculas biológicas (ex. proteínas), levando à perda de função destas mesmas biomoléculas, que passam a ser designadas como produtos finais de glicação avançada (AGEs). Certas proteínas modificadas reduzem a expressão da eNOS através da degradação do mRNA e inibem a atividade dessa mesma enzima, impedindo a sua fosforilação e levando a uma redução da biodisponibilidade do NO. Adicionalmente, os AGEs aumentam a expressão da enzima sintase de monóxido de azoto indutível (iNOS) e do complexo enzimático nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase, aumentando a produção de agentes oxidantes como peroxinitrito (ONOO⁻) sintetizado a partir da reação do NO com o anião superóxido, promovendo *stress* oxidativo, reduzindo a biodisponibilidade do gás vasodilatador, levando à ativação de vias inflamatórias, e conseqüentemente à disfunção celular^{49,52}.

Outro mecanismo de perda de função endotelial associado à síndrome metabólica é, como referido anteriormente, a resistência à insulina. Esta condição pode surgir, devido a uma ingestão calórica excessiva, quando a quantidade de tecido adiposo aumenta e se torna

I. Introdução

disfuncional, resultando num aumento da lipólise e, conseqüentemente, as concentrações de ácidos gordos livres (FFA) não esterificados, em circulação, elevam-se. Os FFA, ao serem metabolizados, vão gerar grandes quantidades dos seus derivados, acetil-CoA, ceramida e diacilglicerol (DAG), e vão ativar vias de *stress* dependentes de cinases (PKC, JNK, IKK β)⁵³. Estas, por sua vez, vão interferir na via de sinalização da insulina (Figura 5), mediada pela enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), e promover a expressão de genes pró-inflamatórios^{16,54,55}. A afetação desta via molecular e o comprometimento da ação da hormona insulina, resultam ainda numa diminuição da estimulação da enzima eNOS e, portanto, no decréscimo da biodisponibilidade de NO, conduzindo à disfunção do endotélio^{53,56}.

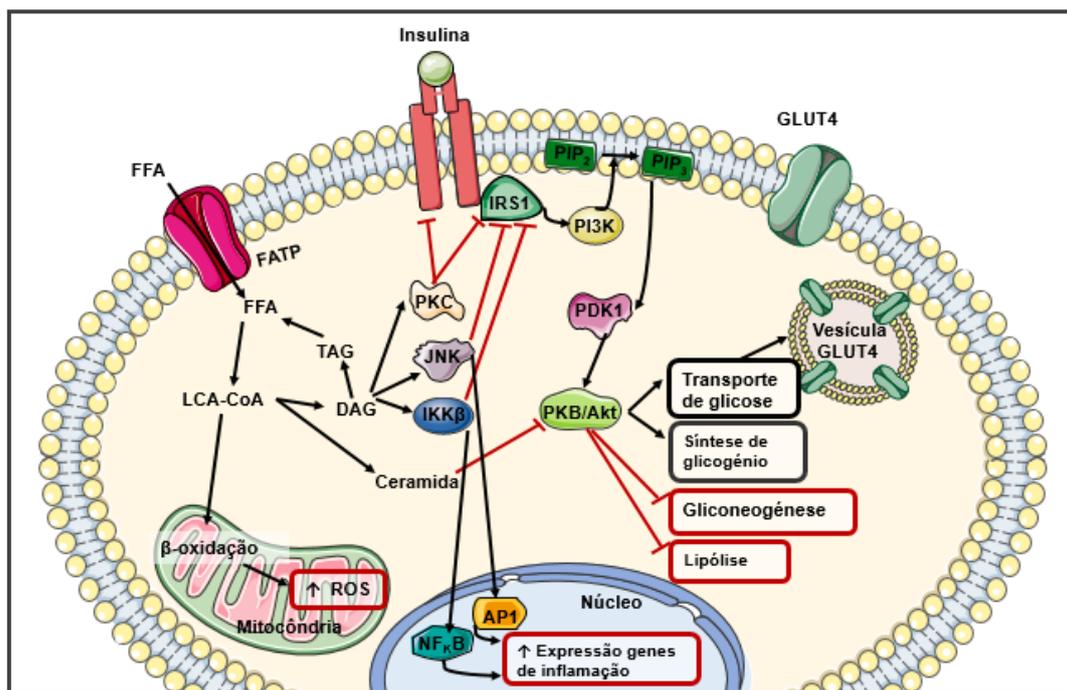


Figura 5 - Resistência à insulina induzida pela disfunção do tecido adiposo, a partir da acumulação de ácidos gordos livres (FFA), levando à ativação de proteínas cinases (PKC, JNK e IKK β) que bloqueiam o recetor e restante via de sinalização da hormona (adaptado de Kalupahana, N. S. *et al.*, 2012).

II. Objetivos

II. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo investigar a influência do tecido adiposo perivascular na função endotelial, num modelo animal diabético, o rato Goto-Kakizaki, e estudar o impacto de uma adipocina, a omentina-1, neste mesmo contexto.

É expectável que a administração de omentina-1 melhore a função endotelial, promovendo a reversão do fenótipo para condições próximas do estado saudável. E assim, esta adipocina possa vir a ser utilizada como agente terapêutico com vista à melhoria da função vascular.

III. Materiais e Métodos

1. Reagentes e produtos

Tabela 3 – Reagentes e outros produtos utilizados durante o trabalho.

Acetilcolina (ACh)	Sigma Aldrich, EUA
Bicarbonato de Sódio (NaHCO ₃)	Merck Darmstadt, Alemanha
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂)	Merck Darmstadt, Alemanha
Cloreto de Potássio (KCl)	Merck Darmstadt, Alemanha
Cloreto de Sódio (NaCl)	Merck Darmstadt, Alemanha
Cloridrato de cetamina	Hikma Farmacêutica, Portugal
Cloropromazina	Lab. Vitoria, Portugal
Dieta A03	Safe, França
Dieta A03 + 20% manteiga de cacau + 1,25% colesterol	Safe, França
Endotelina-1 (ET-1)	Sigma Aldrich, EUA
Fenilefrina (Phe)	Sigma Aldrich, EUA
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	Merck Darmstadt, Alemanha
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma Aldrich, EUA
Glucose 30%	Braun, Alemanha
Indometacina (C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄)	Sigma Aldrich, EUA
Insulina	Lilly, EUA
N ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)	Sigma Aldrich, EUA
O.C.T. Tissue-Tek®	Sakura, Japão
Omentina recombinante	Biovendor, República Checa
Soro Fisiológico (NaCl)	Braun, Alemanha
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	Sigma Aldrich, EUA

2. Materiais

Tabela 4 - Materiais necessários para a realização do trabalho.

Centrífuga	Sigma, Alemanha
Glicómetro e tiras-teste de glicemia Contour Next®	Bayer, Alemanha
Kit ELISA Frutosamina	CusABio Biotech, China
Leitor de lípidos e tiras-teste de triglicérideos e colesterol Accutrend®	Roche, Suíça
Leitor ELISA	BioTek, Inglaterra
Miógrafo	AD Instruments, Austrália
Software GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, EUA
Software LabChart Pro	AD Instruments, Austrália
Tubos colheita de sangue Vacuette®	Greiner Bio-One, Áustria

3. Modelos animais

Para este trabalho foram utilizados, como modelos animais, ratos normais Wistar (W) e ratos com diabetes tipo 2 não obesa, os ratos Goto-Kakizaki (GK), alojados em grupos de 2 ou 3 animais por gaiola. Ambas as estirpes foram obtidas de colónias pertencentes à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e mantiveram-se num ambiente ventilado, com ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão com temperatura (21-25°C) e humidade (50-60%) controlada.

Os animais foram distribuídos pelos seguintes grupos (Figura 6): W - animais saudáveis alimentados com ração padrão; GK - animais diabéticos também alimentados com ração padrão, GKO - animais diabéticos alimentados com a mesma ração e sujeitos a administrações periódicas de omentina recombinante; GKHFD - animais diabéticos alimentados com ração enriquecida em gorduras; GKHFDO - animais diabéticos alimentados com ração enriquecida em gorduras e sujeitos a administrações de omentina.

Todos os animais tiveram livre acesso a água e a ração padrão (dieta padrão A03; Tabela 5) até que completaram os 3 meses de idade. A partir dessa altura os grupos HFD começaram a ser alimentados com ração rica em gorduras (20% manteiga de cacau + 1,25% colesterol) até

III. Materiais e Métodos

à data do seu sacrifício, aos 8 meses de idade. É ainda importante referir que, apesar de os dados não serem apresentados, durante este trabalho, a ingestão da ração foi controlada, tendo sido verificado que os animais sujeitos à dieta gorda ingeriam quantidades equivalentes aos GK alimentados com a dieta padrão (em termos médios eram consumidas, diariamente, cerca de 90 gramas de ração por cada quilograma de animal).

Os animais dos grupos O foram tratados recorrendo a injeções de omentina recombinante ($18 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{dia}$), por via intraperitoneal, durante um mês, antes do sacrifício.

É necessário ressaltar que todos os procedimentos nos animais estiveram de acordo com a Lei Portuguesa na experimentação de animais de laboratório, tal como adotados pela diretiva 2010/63/UE para a realização de experiências com animais.

Tabela 5 - Composição das dietas utilizadas no trabalho (SAFE, França).

	Dieta padrão		Dieta gorda	
	Quantidade (%)	Kcal (%)	Quantidade (%)	Kcal (%)
Proteínas	21,4	25,2	12,3	11
Lípidos	5,1	13,5	23,1	46,4
Hidratos de carbono	52	61,5	47,8	42,6
Kcal/Kg	2830		4482	

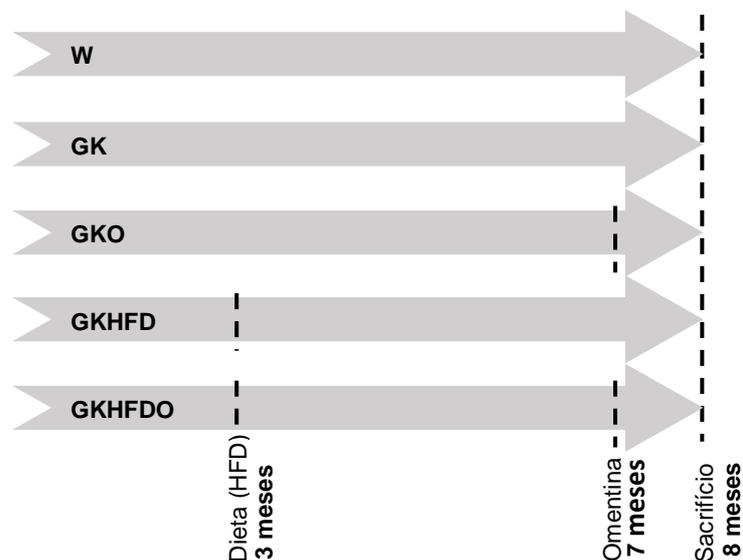


Figura 6 - Representação esquemática dos grupos de animais e cronologia dos respetivos tratamentos.

4. Monitorização dos animais e análises *in vivo*

Antes de iniciarem a dieta rica em gorduras e antes do tratamento com a omentina, os animais foram pesados, determinaram-se os níveis sistémicos de colesterol total, de triglicéridos e a glicemia em jejum, com recurso a analisadores automáticos e respetivas tiras-teste. Os mesmos também foram sujeitos a provas de tolerância à glicose, de acordo com o protocolo enunciado abaixo. Durante os meses de administração da dieta gorda, a quantidade de ração consumida pelos animais, e o peso corporal dos mesmos, foram periodicamente contabilizados.

No final do tratamento, cerca de uma semana antes do sacrifício, foram repetidas as provas de tolerância à glicose e efetuaram-se também provas de tolerância à insulina tal como descritas seguidamente.

Prova de tolerância à glicose

Após um jejum de aproximadamente 14h, aferiu-se o peso e a glicemia de cada animal. Em seguida, foi-lhes administrada glicose ($1,75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) por via intraperitoneal, e determinou-se novamente a glicemia, aos 60 e aos 120 minutos após a injeção de glicose, a partir do sangue da veia da cauda e com recurso a um glicómetro e tiras-teste compatíveis.

Prova de tolerância à insulina

Pesaram-se os animais e mediu-se a glicemia depois de um jejum de 6h. De seguida foi-lhes administrada insulina ($0,25 \text{ U}\cdot\text{Kg}^{-1}$) por via intraperitoneal, medindo-se novamente a glicemia a partir do sangue da veia da cauda, aos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos após a injeção de insulina.

5. Sacrifício e processamento de amostras

Antes do sacrifício determinou-se o peso e a glicemia em jejum, assim como o colesterol total e os triglicéridos sistémicos.

Posteriormente os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cloridrato de cetamina ($75 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) e clorpromazina ($2,65 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$). Realizou-se a técnica de punção cardíaca para a colheita de sangue, para tubos específicos e posterior processamento.

III. Materiais e Métodos

De seguida efetuou-se a eutanásia pelo método de deslocamento cervical e recolheram-se órgãos/tecidos de interesse, neste caso, a artéria aorta com o tecido conjuntivo adjacente.

Processamento de sangues

Os sangues foram centrifugados a 3500 g, 4°C, durante 15 minutos e o soro e o plasma separadamente aliquotados e armazenados a -80°C.

Processamento de aortas

A artéria aorta foi isolada e dissecada de forma a se obterem dois anéis de aproximadamente 4 milímetros de comprimento, tendo-se mantido num deles o respetivo tecido adiposo perivascular, e tendo-se removido, ao outro segmento, todo e qualquer tecido conjuntivo adjacente.

6. Estudos Funcionais

Os dois segmentos, um com PVAT e outro sem, foram montados, individualmente, em câmaras do sistema de banho de órgãos (Figura 7) com capacidade para 5 mL de solução de banho, oxigenada com uma mistura de gases contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂, e a temperatura ajustada para os 37°C.

Estes anéis de aorta encontravam-se ligados a um transdutor de força (*PowerLab*) e foram distendidos a uma tensão de repouso de aproximadamente 1 g, estabelecida previamente como a tensão ideal.

Foram, inicialmente, mantidos durante 45 minutos, em 5 mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit (pH 7,4), com a seguinte composição: 118,6 mM NaCl, 25,0 mM NaHCO₃, 11,0 mM C₆H₁₂O₆, 4,7mM KCl, 1,6 mM CaCl₂, 1,18 mM MgSO₄, 1,18 mM KH₂PO₄.

III. Materiais e Métodos

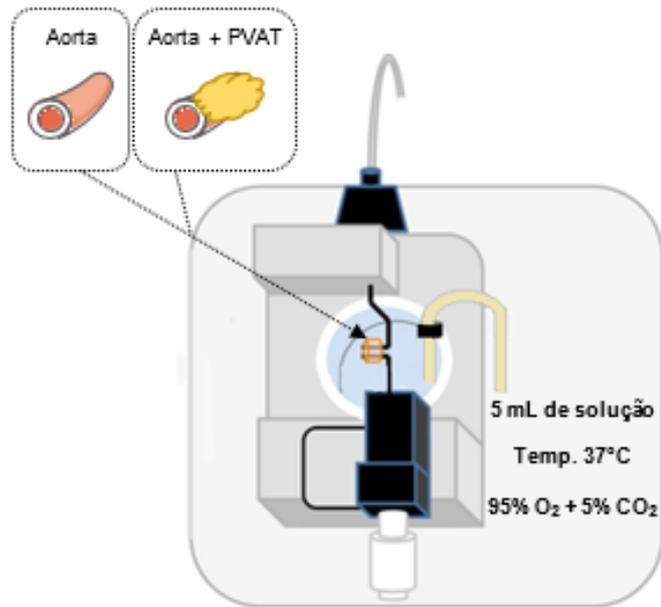


Figura 7 - Representação esquemática da montagem dos anéis de artéria ou de artéria com tecido perivascular nas câmaras do miógrafo (adaptado de Lee, Michelle Hui-Hsin *et al.*, 2014).

Após o equilíbrio, as artérias foram contraídas com uma solução de fenilefrina (Phe, 3 μM) durante 10 minutos, seguida de avaliação do relaxamento através de adições cumulativas de acetilcolina (ACh, 10^{-9} M a 10^{-3} M) em intervalos de 4 minutos (Tabela 6), de forma a avaliar a vasodilatação dependente do endotélio.

No final da dose-resposta à ACh, esperou-se que as artérias voltassem aos valores de tensão de repouso e incubaram-se as artérias, durante 15 minutos, numa solução de Krebs-Henseleit com N ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 300 μM), um inibidor da eNOS.

De seguida, trocou-se a solução por uma com a mesma composição, mas com Phe (3 μM), provocando a contração das artérias e repetiu-se a dose-resposta à ACh.

Realizou-se novamente uma incubação de 15 minutos numa solução de Krebs-Henseleit com L-NAME (300 μM) e indometacina (10^{-8} M), assim, para além de se bloquear a síntese de NO, inibiu-se também a enzima cicloxigenase (COX), responsável pela produção da PGI₂. No final dos 15 minutos, tornou a incubar-se com a mesma solução, à qual se adicionou Phe (3 μM), e efetuou-se nova dose-resposta à ACh.

III. Materiais e Métodos

Tabela 6 - Sequência de adições de acetilcolina (ACh), e concentração desta mesma substância na câmara, durante um ensaio de dose-resposta.

Adição	Concentração
ACh 1	10^{-9} M
ACh 2	10^{-8} M
ACh 3	10^{-7} M
ACh 4	10^{-6} M
ACh 5	10^{-5} M
ACh 6	10^{-4} M
ACh 7	10^{-3} M

No fim deste último ensaio de resposta a diferentes concentrações de ACh, e após o retorno ao basal, realizou-se o estudo de contração com adições cumulativas de endotelina-1 (0,025 μ M a 0,25 μ M), em intervalos de 10 minutos (Tabela 7).

Tabela 7 - Sequência de adições de endotelina-1 (ET-1), e concentração desta mesma substância na câmara, durante um ensaio de dose-resposta.

Adição	Concentração
ET 1	0,025 μ M
ET 2	0,05 μ M
ET 3	0,1 μ M
ET 4	0,25 μ M

Após os 10 minutos de resposta à última adição de endotelina, trocou-se por uma nova solução Krebs-Henseleit, até que as artérias estabilizassem num valor da tensão mínima, o mais próximo possível da sua tensão de repouso.

Desta feita, contraíram-se as artérias com solução de fenilefrina (3 μ M) durante 10 minutos e, de seguida, avaliou-se a resposta de relaxamento induzido pelo dador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP, de 0,001 μ M a 100 μ M), com adições cumulativas em intervalos de 3 minutos (Tabela 8).

III. Materiais e Métodos

Tabela 8 - Sequência de adições de nitroprussiato de sódio (SNP), e concentração desta mesma substância na câmara, durante um ensaio de dose-resposta.

Adição	Concentração
SNP 1	0,001 μ M
SNP 2	0,003 μ M
SNP 3	0,01 μ M
SNP 4	0,003 μ M
SNP 5	0,1 μ M
SNP 6	1 μ M
SNP 7	10 μ M
SNP 8	100 μ M

7. Determinação de frutosamina

Os níveis plasmáticos de frutosamina (albumina glicada) foram determinados para um n de 5-7 animais de cada um dos grupos em estudo, por meio de um kit de ELISA (CusABio Biotech), seguindo as instruções do fornecedor.

8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa *Graph Pad Prism* (versão 6). As comparações entre grupos foram realizadas com recurso a Teste-T (entre 2 grupos apenas), ANOVA de 1 via (mais do que dois grupos), enquanto que diferenças entre grupos, a diversos tempos/medições foram avaliadas através da ANOVA de 2 vias. Todos os resultados estão apresentados com média \pm e.p.m. (erro padrão da média). Os dados são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

IV. Resultados

1. Peso corporal e índice de obesidade

Neste trabalho, como referido no capítulo anterior, foram utilizados ratos com diabetes tipo 2 não obesa (Goto-Kakizaki) mantidos com dieta padrão (GK) ou dieta enriquecida em gordura (GKHFD) e comparados com ratos Wistar (W) não diabéticos; e ratos diabéticos que foram tratados com uma adipocina, a omentina. Deste modo, torna-se pertinente monitorizar o peso corporal e o perfil lipídico dos ratos de maneira a determinarem-se os efeitos da dieta e da omentina nestes parâmetros.

Relativamente ao peso corporal, verificámos que os ratos W apresentaram, no final do estudo, um peso corporal significativamente mais elevado do que os grupos de ratos GK ($p < 0,001$; Tabela 9), tal como já foi descrito anteriormente e é característico desta estirpe. Os diferentes grupos de ratos diabéticos não apresentaram nenhuma diferença de peso corporal no final do estudo.

Tabela 9 – Peso corporal, em gramas, no final do estudo, dos grupos de animais: W (Wistar), GK (GK controlo), GKO (GK tratados com omentina), GKHFD (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras) e GKHFD0 (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras e tratados com omentina). Os valores estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n=7-14$ por grupo.

*** $p < 0,001$ comparação com o grupo W

	W		GK		GKO		GKHFD		GKHFD0	
Peso (g)	478,14 \pm 24,59	n=7	383,07 \pm 4,38	n=13	377,14 \pm 5,33	n=11	393,28 \pm 8,11	n=14	386,97 \pm 5,78	n=11

Calculou-se ainda um índice de obesidade, que correlaciona o comprimento naso-anal, em centímetros, com peso, em gramas, de cada animal, antes e após o tratamento com a adipocina, da seguinte forma: Índice de Lee = $\left(\frac{\text{Comprimento}^{0,33}}{\text{Peso}} \right) \cdot 1000$.

Antes das administrações de omentina, denota-se o efeito da dieta rica em gordura no grupo GKHFD0, com estes animais de 7 meses a apresentarem valores do índice superiores aos controlos da mesma idade ($p < 0,05$), e aos W de 8 meses ($p < 0,001$; Tabela 10).

IV. Resultados

No final do tratamento, houve uma diminuição do índice de Lee nos dois grupos de animais, revelando um efeito da adipocina neste parâmetro. Aos 8 meses verificou-se uma normalização do grupo GKHFDO relativamente aos controlos W e ao grupo GKO, existindo a dissipação das diferenças verificadas antes da administração de omentina.

Tabela 10 - Índice de Lee antes do tratamento com omentina (aos 7 meses) e no final do estudo (aos 8 meses), dos grupos de animais: W (Wistar), GKO (GK tratados com omentina) e GKHFDO (GK alimentados com dieta rica em gorduras e tratados com omentina). Os valores estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m. n=11 por grupo.

***p<0,001 comparação com o grupo W no final do estudo

&'p<0,05; &'&'&'p<0,001 comparação com o grupo GKO antes do tratamento com omentina

Φ'Φ'Φ'p<0,001 comparação com o grupo GKHFDO antes do tratamento com omentina

	W		GKO				GKHFDO			
	Final		Antes da omentina		Final		Antes da omentina		Final	
Índice de Lee	303,79 \pm 6,50	n=7	315,39 \pm 3,56	n=11	296,34 \pm 2,03	n=11	328,57 \pm 3,25	n=11	294,90 \pm 2,33	n=11

2. Perfil lipídico

Relativamente aos níveis de lípidos plasmáticos (Tabela 11), de acordo com o previsto, observaram-se diferenças entre as duas estirpes, Wistar e Goto-Kakizaki. Quer o colesterol total, quer os triglicérideos circulantes estão significativamente mais elevados nos ratos GK relativamente ao grupo W.

Observou-se também que a dieta gorda promoveu um aumento dos níveis sistémicos de triglicérideos e de colesterol total, sendo estes parâmetros claramente superiores no grupo GKHFDO relativamente ao grupo GK.

A adipocina, reduziu a concentração sistémica dos triglicérideos. De notar que, no colesterol total, todos os grupos de animais diabéticos apresentam os valores aumentados relativamente ao controlo W (p<0,001).

Foi ainda possível verificar que os indivíduos pertencentes ao grupo GKHFDO demonstraram ter este valor mais elevado e significativamente diferente do grupo GK controlo, revelando alguma influência da dieta gorda, sendo que este efeito aparenta ter sido ligeiramente atenuado pela administração de omentina nos animais alimentados com esta mesma ração.

IV. Resultados

Tabela 11 - Níveis circulantes de colesterol total ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) e de triglicérides ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) no final do estudo, dos grupos de animais: W (Wistar), GK (GK controlo), GKO (GK tratados com omentina), GKHFD (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras) e GKHFD0 (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras e tratados com omentina). Os valores estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n=8-19$ por grupo.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ comparação com o grupo W

\$ $p<0,05$; \$\$ $p<0,01$ comparação com o grupo GK

&& $p<0,01$; &&& $p<0,001$ comparação com o grupo GKO

	W		GK		GKO		GKHFD		GKHFD0	
Triglicérides ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	84,89 \pm 26,79	n=19	143,14 \pm 4,42	n=14	122,46 \pm 7,00	n=11	177,67 \pm 9,32	n=12	162,75 \pm 7,84	n=8
Colesterol Total ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	80,89 \pm 11,41	n=19	157,73 \pm 1,25	n=15	158,00 \pm 2,05	n=11	168,71 \pm 4,51	n=14	161,13 \pm 1,94	n=8

3. Perfil glicémico

Quando se trabalha com animais diabéticos e se pretende estudar um potencial efeito de terapias, é fulcral analisar-se o perfil glicémico destes animais, avaliando-se a glicemia em jejum e, neste caso, também a frutossamina (FRA, albumina glicada), um indicador de perfil glicémico dos animais nas últimas 2 a 3 semanas.

3.1. Glicemia

Os valores de glicemia após um jejum de 15 horas demonstram inequivocamente diferenças entre W e GK (Figura 8), desde os 3 meses de idade ($p<0,001$), assim como um agravamento e destes valores entre os GK controlo e GKHFD e o grupo W, ao fim dos 8 meses de diabetes ($p<0,001$).

Neste parâmetro, se por um lado parece não existir influência da dieta gorda, por outro, é possível encontrar uma tendência para que os valores de glicemia em jejum sejam reduzidos, após o tratamento com omentina, de tal forma que o grupo GKHFD0 não apresenta diferenças significativas para o grupo W com a mesma idade.

IV. Resultados

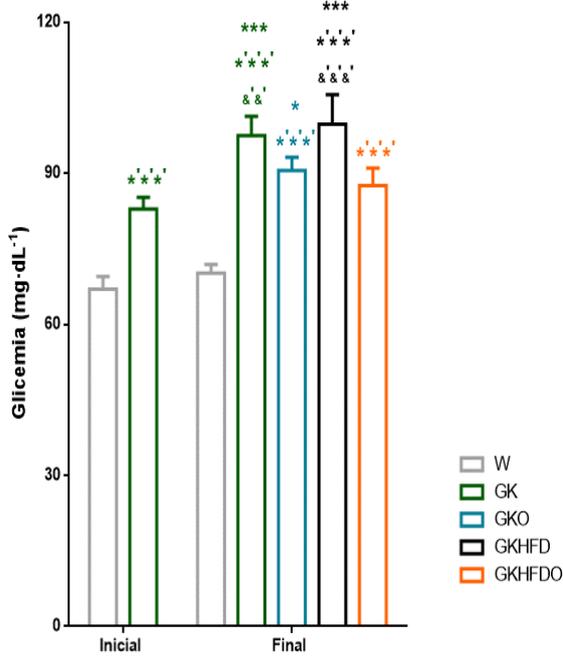


Figura 8 - Valores de glicemia registrados após aprox. 15 horas de jejum ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) no início (lado esq.) e no final (lado dir.) dos tratamentos. Os grupos indicados são: W (Wistar), GK (GK controle), GKO (GK alimentados com dieta padrão e tratados com omentina), GKHF (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras) e GKHFDO (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras e tratados com omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n=7-24$ por grupo.

*'***' $p<0,001$ comparação com o grupo W inicial, com 3 meses de idade

* $p<0,05$; *** $p<0,001$ comparação com o grupo W final, com 8 meses de idade

&'&' $p<0,01$; &'&'&' $p<0,001$ comparação com o grupo GK inicial, com 3 meses de idade

3.2. Frutosamina

Verificou-se que todos os grupos de animais GK têm níveis plasmáticos de frutosamina superiores aos W ($p<0,01$ a $p<0,001$; Figura 9). Em termos estatísticos, também os valores do grupo GKHFDO são mais elevados relativamente aos do GK controle ($p<0,05$), evidenciando a possibilidade de serem os efeitos cumulativos da dieta gorda com a omentina que estão a provocar este aumento visto que, cada um destes fatores por si só, revela um incremento dos níveis de FRA, apesar destes não apresentarem diferenças estatisticamente significativas.

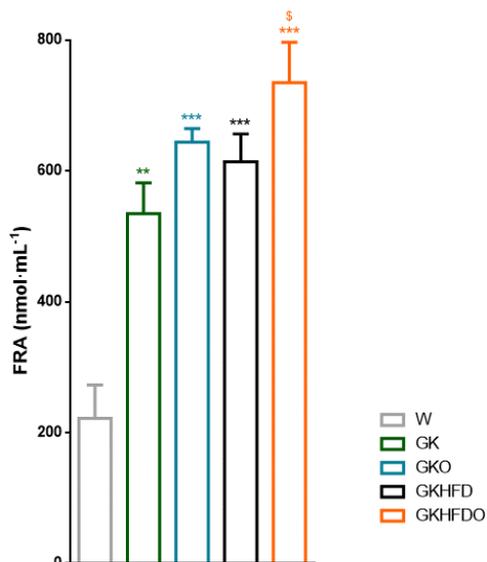


Figura 9 – Níveis plasmáticos de frutosamina (FRA), em $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, determinados no final do estudo, aos seguintes grupos: W (Wistar), GK (GK controle), GKO (GK tratados com omentina), GKHF (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras) e GKHFDO (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras e tratados com omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n=4-8$ por grupo.

** $p<0,01$; *** $p<0,001$ comparação com o grupo W

\$ $p<0,05$ comparação com o grupo GK

4. Metabolismo da glicose

Como já foi referido, a resistência à insulina é a principal característica da diabetes tipo 2. Assim, tendo em conta os animais utilizados para o estudo, e que um dos objetivos do trabalho é a avaliação do impacto da administração de omentina e da dieta gorda nestes animais, realizou-se a prova de tolerância intraperitoneal à glicose (PTG) e à insulina (PTI).

4.1. Prova de tolerância à glicose

Como era esperado, desde o início do estudo, e antes de aplicar qualquer tratamento, foi possível observar claramente as desigualdades na tolerância à glicose entre as duas estirpes (Figura 10), com uma área abaixo da curva (AUC) superior a ser verificada no grupo GK, o que é indicador de menor tolerância ($p < 0,001$).

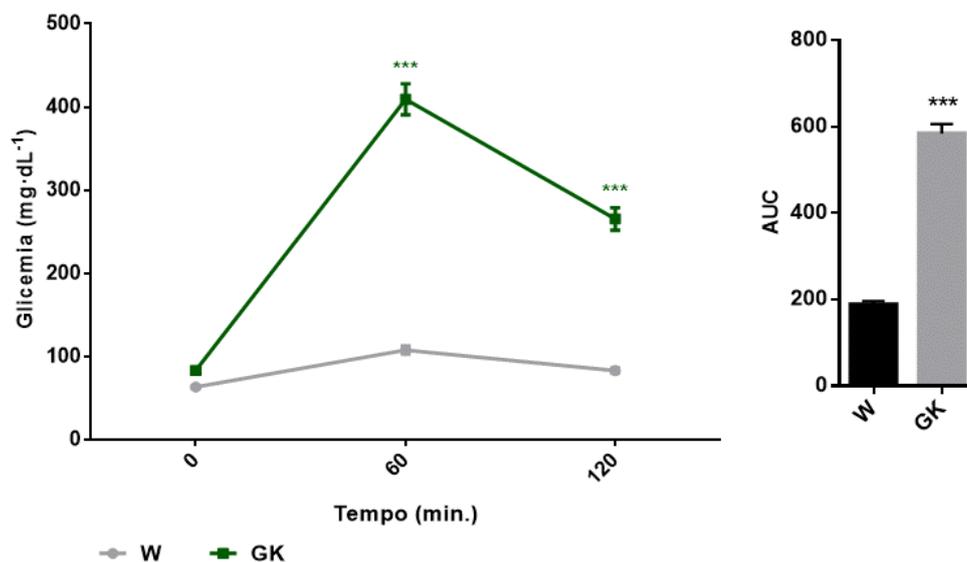


Figura 10 - Prova de tolerância intraperitoneal à glicose realizada antes de iniciar os tratamentos dos animais (3 meses de idade). Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicemia ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) ao longo da prova com duração máxima de 120 minutos e a respetiva área abaixo da curva (AUC) dos seguintes grupos de animais: W (Wistar), GK (GK controlo). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n=3-11$ por grupo.

*** $p < 0,001$ comparação com o grupo W

No final dos 8 meses (Figura 11), as diferenças entre W e GK mantiveram-se ($p < 0,001$), e não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos de animais diabéticos, à exceção de, aos 120 minutos, a glicemia dos animais do grupo GKO ser inferior à

IV. Resultados

dos controles GK ($p < 0,01$). Também se verifica uma tendência idêntica a esta nos GKHFD0 relativamente aos controlos GKHFD, no entanto, sem significado estatístico.

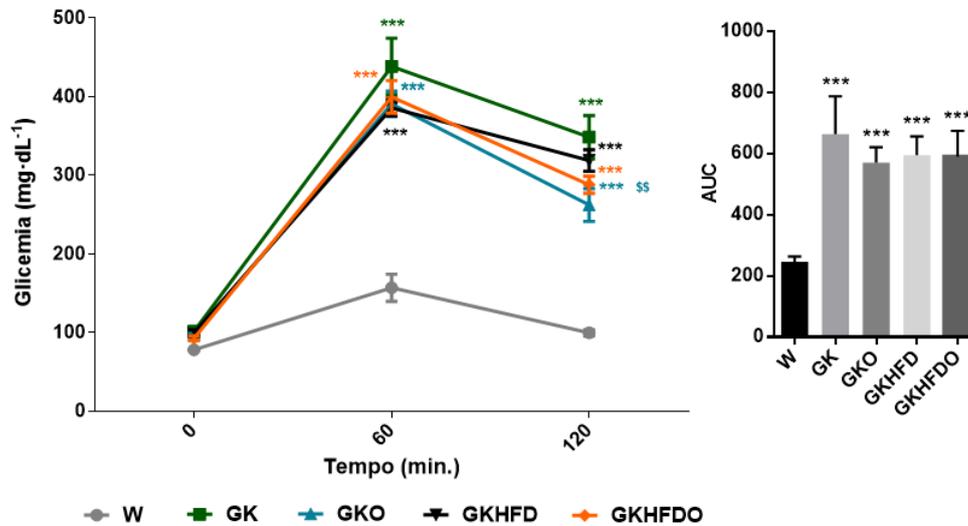


Figura 11 - Prova de tolerância intraperitoneal à glicose realizada no final do estudo. Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicemia ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) ao longo da prova com duração máxima de 120 minutos e a respetiva área abaixo da curva (AUC) dos seguintes grupos: W (Wistar), GK (GK controle), GKO (GK tratado com omentina), GKHFD (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras) e GKHFD0 (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras e tratados com omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n=3-14$ por grupo.

*** $p < 0,001$ comparação com o grupo W

\$\$\$ $p < 0,01$ comparação com o grupo GK

4.2. Prova de tolerância à insulina

Na PTI, realizada em animais com 8 meses de idade, foram mais uma vez observadas as diferenças entre as duas estirpes, visto que os animais GK apresentam uma AUC superior à dos W ($p < 0,01$), comprovando assim a presença de resistência periférica à insulina característica dos animais diabéticos (Figura 12).

IV. Resultados

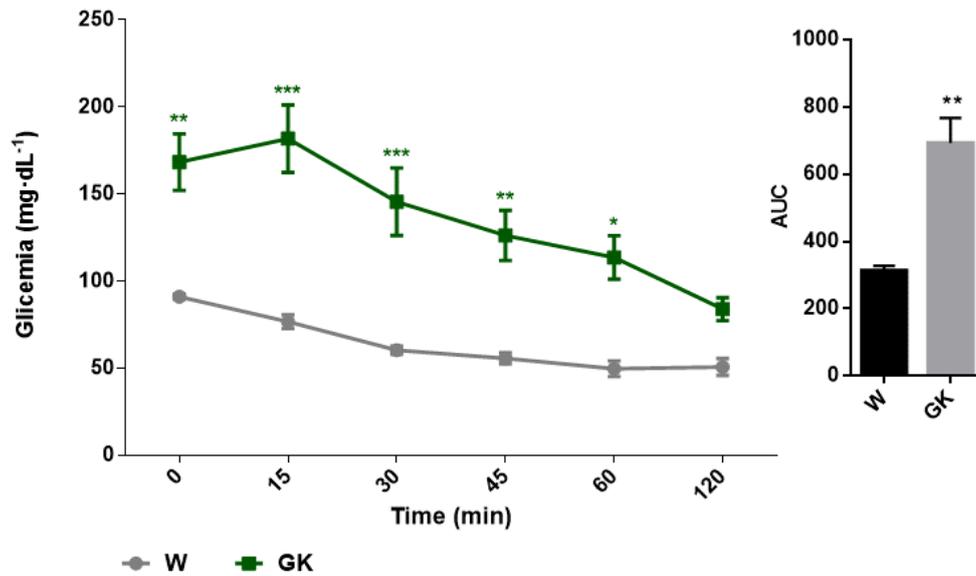


Figura 12 - Prova de tolerância intraperitoneal à insulina realizada no final do estudo. Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicemia (mg·dL⁻¹) ao longo da prova com duração máxima de 120 minutos e as respectivas áreas abaixo das curvas (AUC) dos grupos de animais controle: W (Wistar) e GK (GK controle). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., n=7-13 por grupo.
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 comparação com o grupo W

É possível verificar que existiu um agravamento da resistência a esta hormona provocado pela dieta gorda (Figura 13), tendo em conta o aumento significativo da AUC do grupo GKHFD comparativamente ao GK controle (p<0,001).

Quanto ao tratamento com adipocina nos animais diabéticos, após a administração da omentina, como é visível no gráfico da PTI a glicemia do grupo GKO não apresentou diferenças relativamente ao grupo GK controle. Contudo observa-se uma tendência, relativamente à dieta gorda, que indicia que a adipocina poderá ter algum benefício na sensibilidade à ação da insulina. Assim, no decorrer da PTI, as glicemias do grupo GKHFD relativamente às do grupo GKHFD revelaram uma tendência para serem inferiores, embora não sendo estatisticamente significativas.

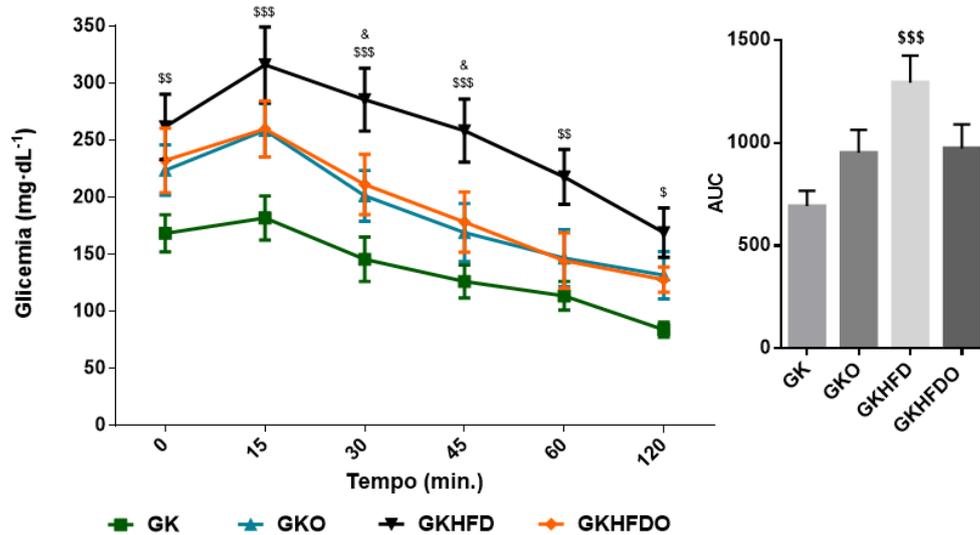


Figura 13 - Prova de tolerância intraperitoneal à insulina realizada no final do estudo. Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicemia ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) ao longo da prova com duração máxima de 120 minutos e as respetivas áreas abaixo das curvas (AUC) dos grupos de animais: GK (GK controlo), GKO (GK tratado com omentina), GKHFD (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras) e GKHFD0 (GK alimentados com dieta enriquecida em gorduras e tratados com omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n=11-13$ por grupo. $^{\$}p<0,05$; $^{\$\$}p<0,01$; $^{\$\$\$}p<0,001$ comparação com o grupo GK SD

5. Função endotelial

Conhecido que é o aumento do risco de desenvolvimento de doença vascular associado à diabetes tipo 2, através da perda de função da camada de células endoteliais realizaram-se estudos isométricos em aorta para se determinar o efeito da dieta gorda e da omentina na função arterial. Para tal, avaliou-se o relaxamento do vaso sanguíneo depende e independente do endotélio.

Para avaliar o impacto do PVAT na função endotelial foram montados anéis de aorta com e sem tecido perivascular e realizadas com curvas dose-efeito a substâncias vasodilatadoras (ACh) e vasoconstritoras (ET-1).

5.1. Efeito do PVAT na função endotelial

A vasodilatação dependente do endotélio foi determinada através de adições cumulativas de acetilcolina (ACh) a segmentos de artéria que tinha sido pré-contraída com fenilefrina (Phe).

IV. Resultados

A partir da Figura 14 foi possível desde logo observar uma diferença muito significativa na função endotelial entre ratos W e GK, com este último grupo a não ultrapassar os 50% de relaxamento máximo, enquanto o controlo saudável se aproxima mais de 100%. De notar que a artéria aorta, dos animais W, montada com tecido perivascular (W+PVAT) relaxa muito mais do que a artéria sem PVAT, com valores significativamente diferentes em dois pontos no gráfico (correspondentes às adições 3 e 5 de ACh) que apresentam uma vasodilatação dependente do endotélio da artéria de W ($p < 0,01$) superior, o que corrobora a tese de que o PVAT saudável tem efeitos benéficos e que promove relaxamento vascular. Contrariamente, no caso dos ratos GK, a artéria com PVAT apresenta um nível de relaxamento significativamente diminuído, nas últimas três adições do agente de vasodilatação, quando comparada com a mesma artéria desprovida de tecido perivascular ($p < 0,05$ e $p < 0,01$).

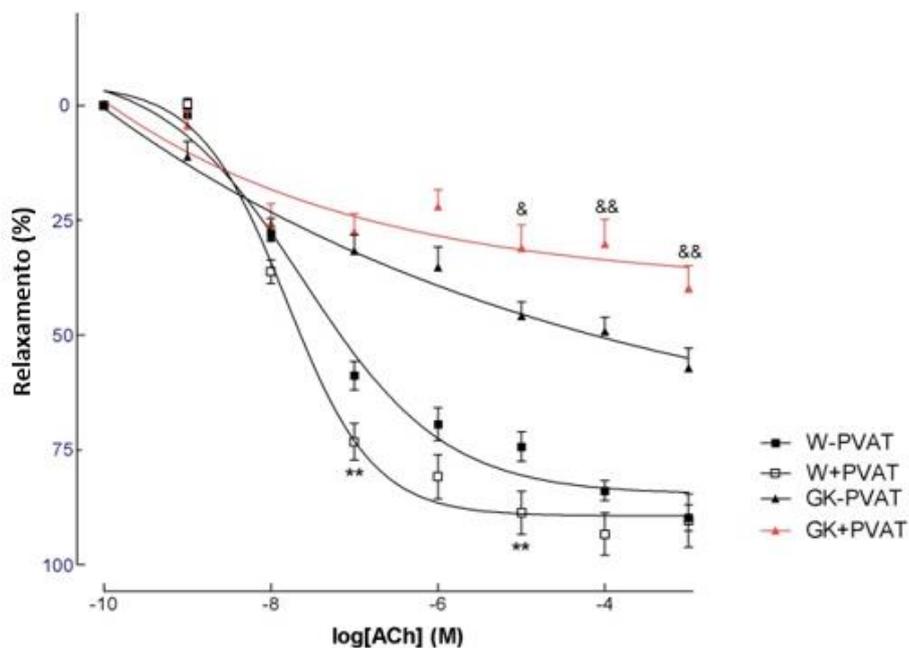


Figura 14 - Curva dose-resposta à acetilcolina dos seguintes grupos: W-PVAT (artéria sem PVAT de Wistar), W+PVAT (artéria com PVAT de Wistar), GK-PVAT (artéria sem PVAT de GK), GK+PVAT (artéria com PVAT de GK). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n = 10-12$, por grupo.

** $p < 0,01$ comparação com o grupo W-PVAT

& $p < 0,05$; && $p < 0,01$ comparação com o grupo GK-PVAT

No ensaio com a ET-1, ficou comprovado o efeito anti-contrátil do PVAT, nos controlos W, pois o W-PVAT respondeu desde a primeira adição do agente de contração e atingiu um valor máximo significativamente superior ao W+PVAT ($p < 0,001$; Figura 15).

IV. Resultados

Os grupos de animais GK com e sem PVAT, não apresentando diferenças significativas entre eles, tendem a contrair mais do que o grupo W+PVAT, e menos que o W-PVAT.

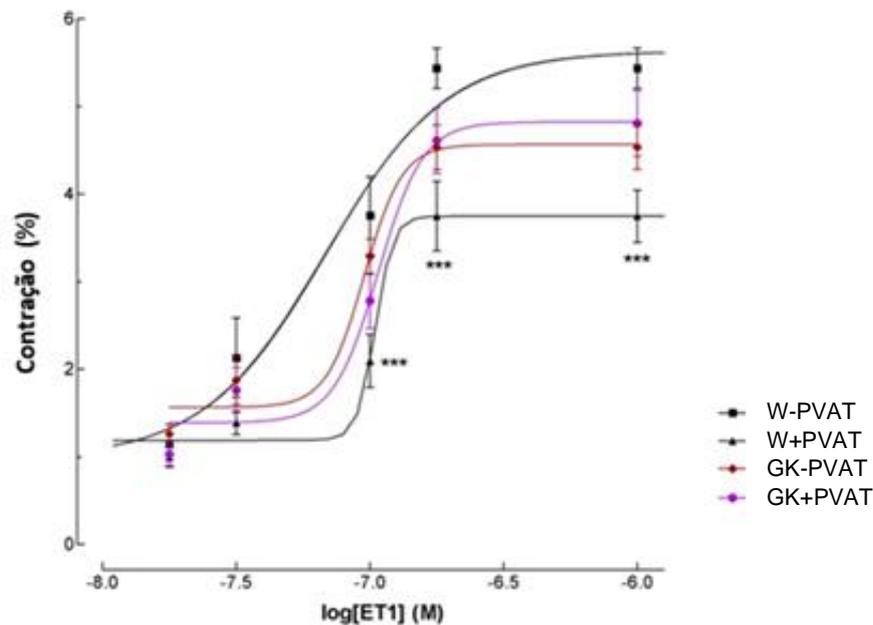


Figura 15 - Curva dose-resposta à endotelina-1 (ET-1) dos seguintes grupos: W-PVAT (artéria sem PVAT de Wistar), W+PVAT (artéria com PVAT de Wistar), GK-PVAT (artéria sem PVAT de GK), GK+PVAT (artéria com PVAT de GK). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., n= 5-10, por grupo.

***p<0,001 comparação com o grupo W-PVAT

5.2. Efeito da omentina na função endotelial

Nesta secção é feita a avaliação da omentina na função endotelial em ratos diabéticos mantidos com dieta padrão e tratados com esta adipocina durante um mês ($18 \mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$). A Figura 16 mostra o efeito da omentina no relaxamento dependente do endotélio, onde se observa um maior relaxamento dependente do endotélio (relaxamento máximo em resposta a acetilcolina de cerca de 75%) e um aumento da sensibilidade à ação da acetilcolina dado que a aorta começa a relaxar mais cedo em resposta a este vasodilatador. Este tratamento melhora o fenótipo do PVAT, dado que o grupo GKO montado com tecido perivascular não agrava a disfunção endotelial, como acontece no caso do grupo GK controlo, e existe uma tendência de recuperação do fenótipo a favor da dilatação embora não seja significativo, relativamente ao GKO sem PVAT. De salientar que a omentina melhora a disfunção endotelial quer comparando os controlos GK

IV. Resultados

montados sem PVAT (GK-PVAT vs GKO-PVAT, $p < 0,001$), como os GK montados com tecido perivascular envolvente (GK+PVAT vs GKO+PVAT, $p < 0,001$).

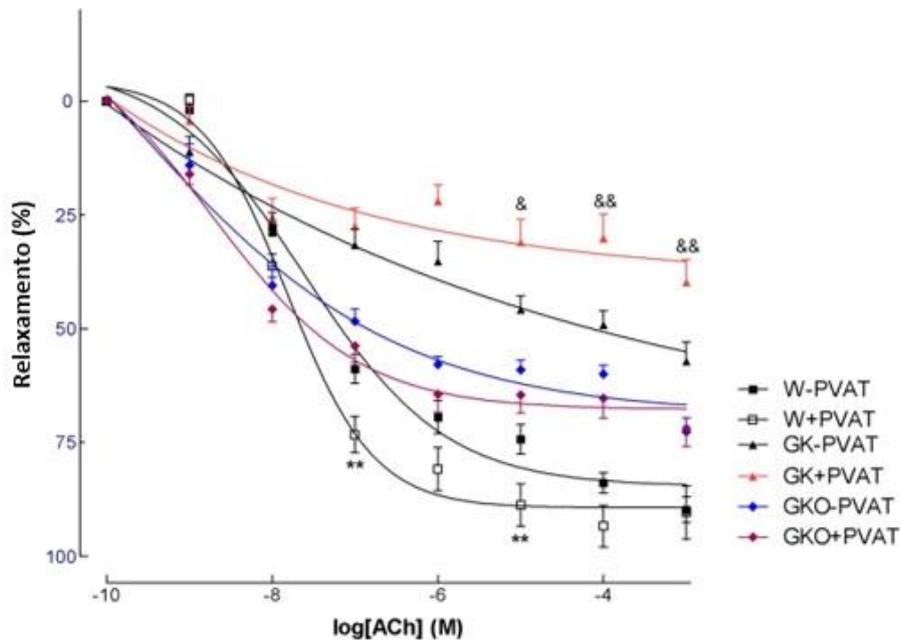


Figura 16 - Curva dose-resposta à acetilcolina dos seguintes grupos: W-PVAT (artéria sem PVAT de Wistar), W+PVAT (artéria com PVAT de Wistar), GK-PVAT (artéria sem PVAT de GK), GK+PVAT (artéria com PVAT de GK), GKO-PVAT (artéria sem PVAT de GK tratado com omentina), GK+PVAT (artéria com PVAT de GK tratado com omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., $n = 10-12$ por grupo.

** $p < 0,01$ comparação com o grupo W-PVAT

& $p < 0,05$; && $p < 0,01$ comparação com o grupo GK-PVAT

Relativamente ao grupo de animais submetidos à dieta gorda (GKHFD), não existem diferenças significativas relativamente ao grupo de ratos GK mantidos com dieta padrão (GK), apenas se nota um ligeiro agravamento na vasodilatação em resposta a acetilcolina, apesar de não ser significativo (Figura 17). Quando efetuamos o tratamento com omentina em animais alimentados com ração rica em gorduras (GKHFD0) observamos um efeito de normalização completa da função endotelial (que deixa de ser significativamente diferente de um rato W), tendo este tratamento sido mais efetivo do que a administração de omentina em animais mantidos com a dieta padrão. Neste caso, este grupo (GKHFD0) quando montado com PVAT parece não ter qualquer efeito adicional não se observando o efeito vasodilatador devido à presença de tecido perivascular.

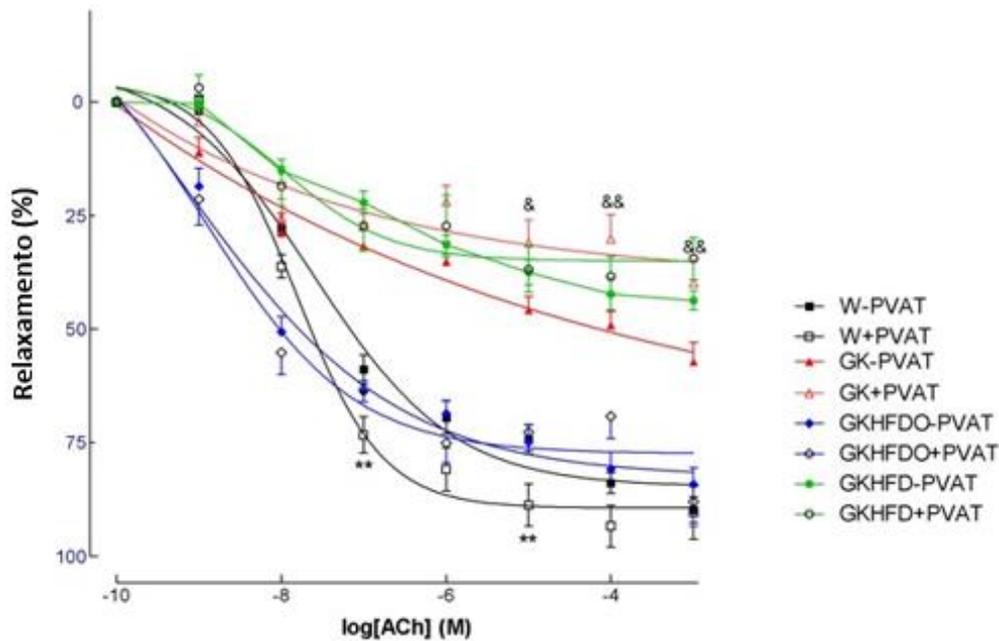


Figura 17 - Curva dose-resposta à acetilcolina dos seguintes grupos: W-PVAT (artéria sem PVAT de Wistar), W+PVAT (artéria com PVAT de Wistar), GK-PVAT (artéria sem PVAT de GK controlo), GK+PVAT (artéria com PVAT de GK controlo), GKHFDPVAT (artéria sem PVAT de GK tratado com dieta rica em gordura), GKHF+PVAT (artéria com PVAT de GK tratado com dieta rica em gordura) GKHFDO-PVAT (artéria sem PVAT de GK tratado com dieta rica em gordura e omentina), GKHFDO+PVAT (artéria com PVAT de GK tratado com dieta rica em gordura e omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., n= 10-12 por grupo.

** $p < 0,01$ comparação com o grupo W-PVAT

& $p < 0,05$; && $p < 0,01$ comparação com o grupo GK-PVAT

5.3. Efeito de L-NAME e de indometacina e o relaxamento independente do endotélio

A incubação dos segmentos de aorta com L-NAME, um inibidor da eNOS, enzima responsável pela síntese de NO, permite avaliar a vasodilatação mediada por outros vasodilatadores.

As diferenças entre os grupos verificadas anteriormente dissipam-se quando a eNOS é inibida, terminando todos eles, incluindo o grupo controlo W, com um relaxamento máximo inferior a 40% (Figura 18).

IV. Resultados

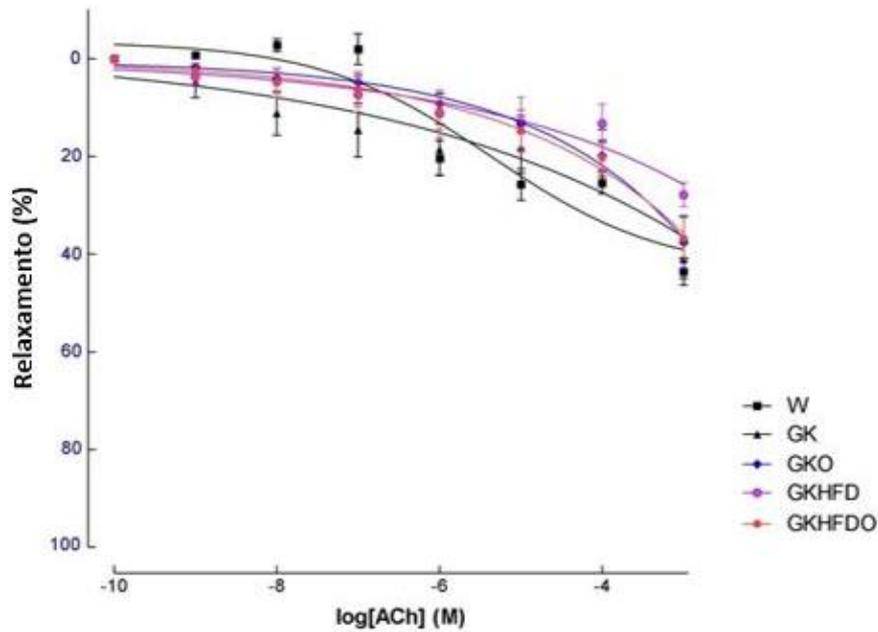


Figura 18 - Curva dose-resposta à acetilcolina (ACh) na presença de L-NAME dos seguintes grupos: W (Wistar), GK (GK controle) GKO (GK tratado com omentina), GKHFD (GK tratado com dieta rica em gordura), GKHFD0 (GK tratado com dieta rica em gordura e omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., n= 10-12 por grupo.

Noutro ensaio, para além do L-NAME, foi adicionado um inibidor da enzima cicloxigenase (COX), a indometacina, com o objetivo de reduzir a produção de PGI₂. Na Figura 19 é possível notar-se um ligeiro aumento na percentagem de relaxamento atingida no final das adições de ACh.

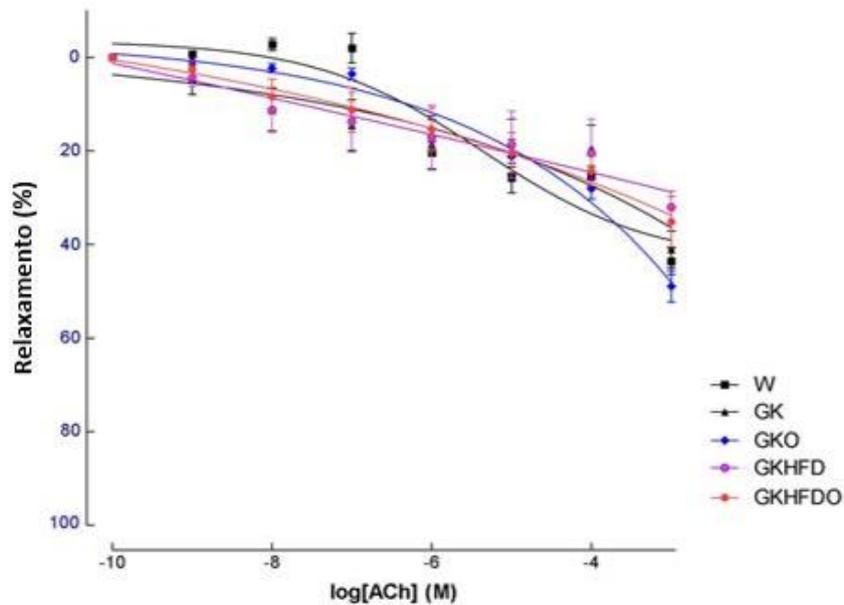


Figura 19 - Curva dose-resposta com acetilcolina (ACh) na presença de L-NAME e indometacina dos seguintes grupos: W (Wistar), GK (GK controle) GKO (GK tratado com omentina), GKHFD (GK tratado com dieta rica em gordura), GKHFD0 (GK tratado com dieta rica em gordura e omentina). Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m., n= 10-12 por grupo.

IV. Resultados

Analisando o perfil de relaxamento independente do endotélio na artéria aorta, desta vez com a ação do dador de NO, o SNP, não há diferenças estatisticamente significativas entre grupos e o relaxamento foi de praticamente 100% (Figura 20).

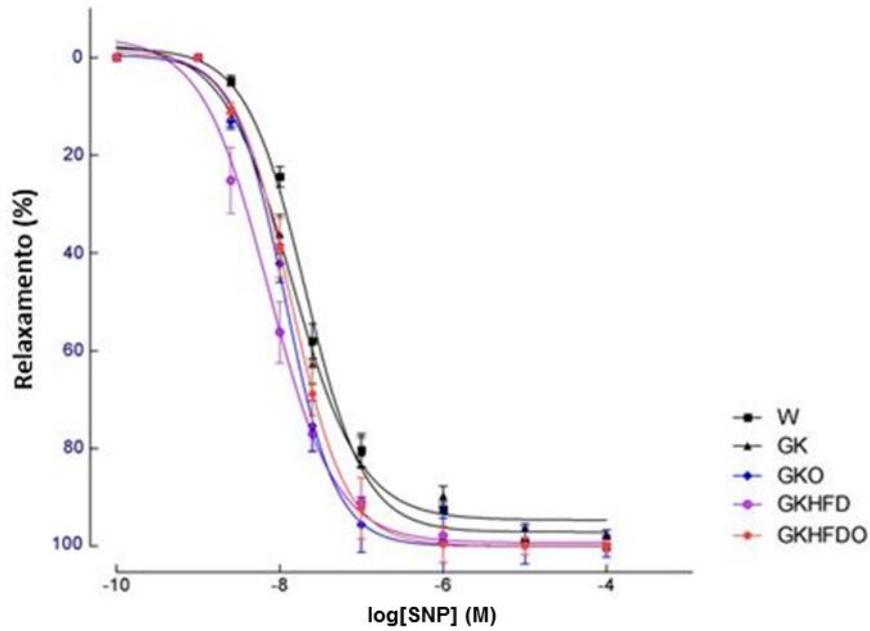


Figura 20 - Curva dose-resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP) dos seguintes grupos: W (Wistar), GK (GK controle), GKO (GK tratado com omentina), GKHFD (GK tratado com dieta rica em gordura), GKHFD0 (GK tratado com dieta rica em gordura e omentina). Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm e.p.m., n= 10-12 por grupo.

V. Discussão

A diabetes *mellitus* tipo 2, a par com a obesidade, tem vindo a adquirir proporções cada vez maiores, sendo já considerada uma epidemia que acarreta outros problemas de saúde como hipertensão, entre outros problemas cardiovasculares. Assim, torna-se imperativo estudar novas possibilidades de abordagens terapêuticas que visem melhorar a qualidade de vida destes indivíduos diabéticos e que possam ser eficazes também na redução das co-morbilidades associadas a esta patologia.

No presente trabalho foi testado o potencial terapêutico da administração de uma adipocina, a omentina-1, na disfunção endotelial associada à diabetes *mellitus* tipo 2. Outro objetivo do estudo foi avaliar o impacto do tecido adiposo perivascular na disfunção endotelial, em condições patológicas, na ausência, e na presença, da dieta gorda e de omentina exógena.

Para isso foram utilizados dois tipos de modelos animais e diferentes dietas. Utilizaram-se ratos normais (Wistar) alimentados com dieta padrão, ratos diabéticos não obesos (Goto-Kakizaki) alimentados com dieta padrão, e ratos GK alimentados com uma dieta gorda, com o intuito de simular os erros alimentares da população atual, e assim agravar as características da diabetes.

Foram avaliados diversos parâmetros *in vivo* como o peso corporal, o comprimento naso-anal, níveis sistêmicos de colesterol total e triglicéridos, os níveis de glicose em jejum, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (através de provas de tolerância à glicose e à insulina, respetivamente). Ao nível vascular foi estudado *ex vivo* o relaxamento dependente e independente do endotélio e a contração do endotélio em resposta à endotelina-1.

O peso corporal no final do estudo evidenciou diferenças significativas entre os ratos Wistar e os ratos Goto-Kakizaki. Os animais do grupo GK apresentaram um peso corporal 20% inferior ao dos ratos Wistar com a mesma idade, o que está de acordo com os valores encontrados na literatura que referem diferenças de 10 a 30%⁵⁷. Verificou-se também que, nem a dieta gorda nem a adipocina administrada, tiveram influência no peso corporal aos 8 meses de idade. Porém, quando correlacionamos o peso dos animais com o seu comprimento, através do cálculo do índice de Lee, já se verificam diferenças significativas entre os grupos. Este índice é equivalente ao índice de massa corporal (IMC) de humanos, mas com especificidade para o rato, sendo os animais com valores acima de 310 considerados obesos⁵⁸. Assim, antes do tratamento

com a omentina, os dois grupos de GK apresentaram excesso de peso. O grupo GKHFDO, que até aos 7 meses tinha sido alimentado com a ração gorda, apresentava um índice de Lee significativamente superior relativamente aos grupos de GK mantidos com a dieta padrão, o que vai de encontro ao que já tinha sido descrito⁵⁹.

De forma concomitante, também se confirmou que a dieta gorda provocou uma hipertrigliceridemia, uma vez que os grupos GKHFD e GKHFDO tiveram os níveis sistémicos de triglicéridos aumentados em relação ao controlo GK, o que está de acordo com anteriores investigações⁶⁰.

O colesterol total, contudo, não sofreu modificações muito significativas (com exceção do valor de $p < 0,05$ de GKHFD em relação a GK), por ação da dieta rica em gordura, possivelmente pelo facto de as quantidades de colesterol (1,25%) presente nesta ração não terem sido suficientes para provocar o aumento da sua concentração sistémica nestes animais. Aliás, esta é uma situação que pode ocorrer sempre que se utilizam rações sintetizadas com composições originais, na medida em que não sabemos como é que os animais poderão lidar com a nova ração, existindo animais com resistência à indução de obesidade através da dieta.

Ainda em relação ao colesterol total e à sua homogeneidade entre praticamente todos os grupos de ratos GK, esta poderá ser pouco reveladora do que os tratamentos estarão, na realidade, a provocar, pois é possível que tenham existido modificação das proporções das suas frações HDL, LDL e VLDL, como já se verificou noutros estudos⁶¹. Sendo presumível que os animais alimentados com dieta gorda apresentem concentrações superiores de LDL, VLDL e inferiores de HDL, apesar dos níveis de colesterol total serem idênticos aos dos ratos tratados com a dieta padrão. Para se obter informações mais conclusivas sobre o efeito da dieta e da omentina ao nível da colesterolemia será necessário realizar outros ensaios para quantificar as várias frações do colesterol nos diversos grupos de animais.

Em relação à omentina sabe-se que, em humanos, os seus níveis circulantes se correlacionam negativamente com o IMC, o perímetro da cintura e com a concentração plasmática de leptina, e também com a diabetes, com marcadores de síndrome metabólica e de doença cardiovascular⁶². Existem ainda dados indicativos de que indivíduos obesos, após uma perda de peso, aumentam os níveis plasmáticos de omentina⁶³. Em concordância, neste estudo

verificou-se que a administração desta adipocina exógena levou a um decréscimo do índice de Lee, em ambos os grupos de animais diabéticos, para valores similares aos dos animais saudáveis e observou-se também uma ligeira redução, apesar de não ser significativa, da concentração de triglicérides plasmáticos.

No que respeita ao perfil glicémico, a adipocina também apresentou uma ação benéfica sobre a glicemia em jejum, tendo ambos os grupos deste tratamento revelado, inequivocamente, uma melhoria nesta componente, enquanto a dieta por si só demonstrou não ter qualquer influência neste parâmetro, o que está de acordo com outros estudos realizados também em rato⁶⁴.

Por outro lado, a omentina levou a um aumento da glicação de albumina no grupo mantido com dieta rica em gorduras. Poderá ter sido um efeito que ocorreu num conjunto de ratos que já tinham um valor de glicação mais elevado que os dos restantes grupos (variações dentro da espécie) ou, muito provavelmente, estes animais possuíam maiores níveis de proteínas plasmáticas, nomeadamente de albumina total, e conseqüentemente maior concentração desta molécula glicada (frutosamina), pelo que seria necessário realizar a normalização destes resultados para os níveis de albumina plasmática total. E, como se pode verificar, este resultado relativo ao grupo GKHFDO não é corroborado pelas provas de tolerância à glicose, e à insulina, que se seguem.

À exceção das diferenças mais que evidentes entre os animais Wistar e os GK, nas provas de tolerância à glicose (PTG), demonstradas também em investigações prévias⁶⁰, a dieta gorda e a omentina não demonstraram ter qualquer influência na PTG dos indivíduos diabéticos. No entanto, foram verificadas diferenças relativas às provas de tolerância à insulina (PTI). Observa-se que a dieta gorda causou um agravamento bastante significativo da insulino-resistência, e tal foi também verificado em estudos anteriores⁶⁵. No caso dos tratamentos com a omentina não se observou um efeito significativo no grupo GKO, porém no grupo GKHFDO, observa-se um ligeiro aumento da sensibilidade à insulina. Esta tendência está de acordo com o que vem descrito na literatura, sendo que estudos anteriores referem que esta adipocina promove o aumento da fosforilação da enzima proteína cinase B, da via da PI3K, que assim faz aumentar o transporte de glicose mediado pela insulina³².

V. Discussão

A disfunção endotelial caracteriza-se pela modificação das concentrações dos mediadores que esta camada celular produz e liberta, havendo um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores, como o NO, relativamente às substâncias vasoconstritoras, conduzindo a alterações no funcionamento normal da vasculatura⁴⁹. Em patologias, como a diabetes *mellitus* tipo 2 e a obesidade, ocorre o aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, o incremento dos níveis de ácidos gordos livres em circulação, de resistência à insulina e hiperglicemia, que causam alterações na expressão genética e na sinalização celular, comprometendo a função vascular⁶⁶.

Assim sendo, estudou-se o funcionamento da artéria aorta com o objetivo de se averiguar a interferência da dieta gorda e da omentina na disfunção endotelial de ratos diabéticos. Foi também avaliado o impacto da presença do tecido adiposo perivascular no vaso sanguíneo. Para estes estudos utilizou-se acetilcolina (ACh), que tem como ação a estimulação do recetor muscarínico M3, existente na célula endotelial, a libertar NO. Este gás difunde para as células musculares lisas e ativa a hemoproteína guanilato ciclase solúvel (sGC), que por sua vez aumenta os níveis de cGMP e induz o relaxamento das células musculares lisas, provocando a vasodilatação^{67,68}.

Os resultados obtidos são concordantes com o que já vem sido descrito na literatura, ou seja, os grupos GK controlo e os GKHFD, apresentam uma evidente diminuição da resposta vasodilatadora em resposta à acetilcolina comparativamente com os animais Wistar⁶⁷. A diminuição do relaxamento dependente do endotélio nos animais do grupo GK e do GKHFD vem comprovar que os indivíduos diabéticos apresentam disfunção endotelial. Um fator crucial para tal acontecimento é a insulino-resistência, característica da diabetes tipo 2. Uma vez que a insulina, para além da sua ação no transporte de glicose, também tem a capacidade de estimular a produção de NO pelas células endoteliais, e assim promover a vasodilatação. Isto ocorre através da ativação da via de sinalização da PI3K, que leva à fosforilação da eNOS e, consequentemente, ao incremento da concentração de NO⁵⁶. Porém, esta hormona é igualmente responsável pela ativação da via da MAPK, que o contrário do que acontece na PI3K promove a produção de vasoconstritores como a endotelina-1. Em condições fisiológicas, as duas estão em equilíbrio, porém na insulino-resistência a via da PI3K apresenta uma menor atividade enquanto a outra se mantém inalterada, conduzindo à perda de função da camada endotelial⁶⁹. Noutro

estudo, este evento está associado a uma hiperglicemia crônica podendo ser revertido, caso se normalize a glicemia⁷⁰.

Um outro aspecto interessante apresentado nos resultados foi a influência do tecido adiposo perivascular na função endotelial da artéria aorta. No Wistar, é confirmado o efeito benéfico deste tecido no vaso, aumentando a sua resposta de relaxamento à acetilcolina e diminuindo a resposta contrátil à endotelina-1. Este efeito já tinha sido encontrado, em indivíduos saudáveis, e descrito como sendo a ação anti-contrátil do PVAT sobre os vasos sanguíneos^{42,71}. E que, além de promover a vasodilatação e reduzir a vasoconstrição arterial através da atenuação da resposta vascular a vários agonistas, como a ET-1^{71,72}, este tecido também tem ação anti-inflamatória⁷³.

Porém, no caso dos animais diabéticos GK, o PVAT dos ratos diabéticos exerce a ação contrária, agravando-se a disfunção endotelial e perdendo-se a ação anti-contrátil. Uma explicação possível para tais resultados, é o tecido perivascular dos ratos diabéticos, se encontrar disfuncional, devido à resistência à insulina, que se traduz num estado de hiperinsulinemia e de hiperglicemia constante, resultando num ambiente pró-inflamatório e pró-oxidante^{42,50}.

A administração de dieta gorda não agravou a disfunção endotelial presente nos ratos diabéticos, pois não se encontraram diferenças significativas entre estes animais (GKHFD) e os GK controle, dado que estes últimos já demonstravam um elevado grau de disfunção das células endoteliais promovido pela resistência à insulina e pela hiperglicemia⁵⁰.

Todavia, após os tratamentos com a omentina, observaram-se melhorias na vasodilatação dependente do endotélio, visto que a percentagem de relaxamento dependente do endotélio aumentou significativamente, e a sensibilidade à ACh aumentou, ou seja, aconteceu mais cedo do que nos ratos Wistar, nos GK e nos GKHFD. Isto pode ser explicado devido à ação anti-inflamatória que a omentina exerce nas células endoteliais, ao inibir a atividade do fator de transcrição de genes de inflamação, como o fator nuclear NF- κ B, e da cinase JNK, que também induz a resposta inflamatória³² e, adicionalmente melhora a sensibilidade à insulina, tornando a via PI3K mais ativa, e estimulando a fosforilação da eNOS, que leva ao aumento da síntese de NO, e conseqüentemente, à vasodilatação. A omentina desempenha ainda outras funções na

parede arterial, nomeadamente a restrição da adesão de monócitos, tanto no endotélio como no músculo liso^{25,31}. Assim, temos uma ação direta da omentina nestes dois tipos celulares que constituem a parede dos vasos, e uma ação indireta ao modular o PVAT. Por exemplo, ao reduzir a inflamação neste tecido, poderá alterar o seu secretoma, deixando de produzir substâncias que contribuem para a persistência de inflamação local e sistémica e para a vasoconstrição. No grupo de ratos GKHFDO não observamos diferenças significativas entre os segmentos de aorta com PVAT, e sem este tecido, enquanto no GKO é perceptível algum efeito do tecido no incremento do relaxamento dependente do endotélio. Assim, podemos concluir que o tecido perivascular poderá ter sofrido modificações pelo tratamento com a omentina, mas que a adipocina também exerceu efeitos benéficos, por modulação sistémica (redução da inflamação e aumento da sensibilização para a insulina), nas próprias células do endotélio vascular. O grupo de ratos diabéticos submetido à dieta rica em gordura e tratado com omentina (GKHFDO) normalizou a sua função endotelial com valores muito próximos dos animais controlo não diabéticos (W).

O NO é o principal vasodilatador e a redução da sua biodisponibilidade é o evento que caracteriza a disfunção do endotélio⁷⁴, no entanto existem outras substâncias com ação vasodilatadora, como a prostaglandina PGI₂, ou o EDHF. Para avaliar o nível de disfunção endotelial, começou-se pela inibição da produção do NO, e num ensaio seguinte, adicionalmente bloqueou-se a síntese de PGI₂, utilizando L-NAME e indometacina, respetivamente. Como resultado destes dois ensaios, verificou-se que o relaxamento ficou substancialmente comprometido em todos os grupos de animais, sem se encontrarem diferenças significativas entre os mesmos. Esta diminuição da vasodilatação, é consistente com outras investigações, pois revela que na diabetes o que é afetado efetivamente é o relaxamento dependente do NO^{45,67}, pois quando a eNOS está inibida, deixam de existir diferenças entre os grupos de ratos GK e de ratos normais W.

No que diz respeito ao relaxamento independente do endotélio realizou-se o ensaio de relaxamento em resposta ao SNP, dador de NO, as artérias de todos os grupos responderam de forma similar, com total relaxamento, corroborando a restante informação obtida dos vários ensaios de estudo da função vascular do presente trabalho, que também são confirmados por resultados obtidos em estudos precedentes⁷⁵.

VI. Conclusão

VI. Conclusão

Neste trabalho testou-se o efeito da adipocina omentina-1, no perfil metabólico e na disfunção endotelial, em modelos animais diabéticos não obesos e com a utilização de uma dieta rica em gordura. Avaliou-se também a influência do PVAT no funcionamento da vasculatura.

Foi possível confirmar-se que ratos diabéticos, em comparação com não diabéticos, apresentam modificações no perfil lipídico e glicêmico e no metabolismo da glicose, e ainda alterações ao nível do funcionamento vascular - disfunção endotelial. Essa disfunção demonstrou-se ser devida ao comprometimento do relaxamento dependente do endotélio, mais concretamente dependente do bom funcionamento da enzima eNOS e da biodisponibilidade e ação do seu produto (NO).

Por outro lado, a dieta gorda utilizada provocou um incremento de adiposidade e dos triglicérides, e agravou a resistência à insulina verificada no diabético o que, naturalmente, fez aumentar a glicemia em jejum.

Comprovou-se a ação benéfica da omentina na redução dos níveis de adiposidade e no aumento da sensibilidade à insulina, no entanto ainda ficaram por esclarecer os mecanismos pelos quais a omentina causou este efeito, sendo necessários mais estudos para perceber onde a adipocina poderá estar a atuar. Acredita-se que poderá ter sido a sensibilização para a insulina o fator crucial para a reversão de muitos dos restantes parâmetros fisiológicos verificados nestes animais, como por exemplo, a redução dos níveis glicêmicos e de triglicérides sistêmicos, dado que ao reduzir a insulino-resistência no tecido adiposo este também recupera um pouco da sua função e melhorando o metabolismo da glicose e dos lípidos. Por último também se demonstrou que a adipocina, muito provavelmente também decorrente do aumento da sensibilidade à insulina, como já foi apresentado na discussão, também estimulou uma recuperação da função endotelial.

No que respeita ao segundo objetivo deste trabalho, provou-se que, em condições fisiológicas, o PVAT tem efeitos de proteção do vaso sanguíneo, inibindo contrações mais exacerbadas (ação anti-contrátil). Contudo, em estados de insulino-resistência e de inflamação crónica, como os que se encontram em patologias como a diabetes e a obesidade, o PVAT, bem como o seu secretoma, encontram-se modificados, acabando por perder a sua ação anti-contrátil e levando à disfunção do endotélio. Este estudo permitiu ainda perceber que a omentina, além

VI. Conclusão

de melhorar a função endotelial dos ratos diabéticos, resgata o fenótipo anti-contrátil do tecido adiposo perivascular.

Ainda estão por esclarecer os mecanismos através dos quais a omentina proporcionou estes múltiplos efeitos terapêuticos, tanto a nível sistémico, como a nível do vaso sanguíneo e do seu tecido adiposo perivascular. E será interessante também descobrir-se quais são as moléculas segregadas pelo PVAT que vão interferir com a função vascular.

Em suma, e não descurando a necessidade de serem realizados estudos complementares, podemos concluir que, à partida, a omentina demonstra ter um elevado potencial terapêutico para o tratamento de patologias como a diabetes, a obesidade e das respetivas co-morbilidades associadas.

VII. Referências bibliográficas

VII. Referências bibliográficas

1. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* (2014). doi:10.1155/2014/943162
2. Kawakami, K. & Yoko, M. N. Abdominal Obesity: Why it Matters. *J. Obes. Weight Loss Ther.* **4**, 1–2 (2013).
3. Kautzky-Willer, A., Harreiter, J. & Pacini, G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Reviews* **37**, 278–316 (2016).
4. International Diabetes Federation. *IDF diabetes atlas.* (2015). doi:10.1289/image.ehp.v119.i03
5. Wheatcroft, S. B., Williams, I. L., Shah, A. M. & Kearney, M. T. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet. Med.* **20**, 255–268 (2003).
6. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 85–97 (2011).
7. Skovsø, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J. Diabetes Investig.* **5**, 349–358 (2014).
8. Kotchen, T. A. Obesity-Related Hypertension: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Management. *Am. J. Hypertens.* **23**, 1170–1178 (2009).
9. Liepinsh, E. *et al.* Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 1549–1556 (2009).
10. Mathieu, P., Lemieux, I. & Després, J. P. Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin. Pharmacol. Ther.* **87**, 407–416 (2010).
11. Pinto, R. P., Nunes, A. A. & Mello, L. M. de. Analysis of factors associated with excess weight in school children. *Rev. Paul. Pediatr. (English Ed.)* **34**, 460–468 (2016).
12. James, O. H. & John, C. P. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science (80)*. **280**, 1371–4 (1998).

VII. Referências bibliográficas

13. North, B. J. & Sinclair, D. A. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ. Res.* **110**, 1097–1108 (2012).
14. Chen, S. & Tseng, C.-H. Dyslipidemia, kidney disease, and cardiovascular disease in diabetic patients. *Rev. Diabet. Stud.* **10**, 88–100 (2013).
15. González, N., Villegas, Z. M., Bris, A. G., Egido, J. & Lorenzo, Ó. Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity and diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.* 1–11 (2017). doi:10.1186/s12933-017-0528-4
16. Odegaard, J. & Chawla, A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat. Clin. Pr. Endocrinol. Metab.* **4**, 619–626 (2008).
17. Avramoglu, R. K., Basciano, H. & Adeli, K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clinica Chimica Acta* **368**, 1–19 (2006).
18. Maury, E. & Brichard, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* **314**, 1–16 (2010).
19. Galic, S., Oakhill, J. S. & Steinberg, G. R. Molecular and Cellular Endocrinology Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 129–139 (2010).
20. Boutens, L. & Stienstra, R. Adipose tissue macrophages: going off track during obesity. *Diabetologia* **59**, 879–894 (2016).
21. Szasz, T., Bomfim, G. F. & Webb, R. C. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc. Health Risk Manag.* **9**, 105–116 (2013).
22. Trayhurn, P. & Wood, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **92**, 347 (2004).
23. Lafontan, M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab.* **40**, 16–28 (2014).
24. Shoelson, S. E., Herrero, L. & Naaz, A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* **132**, 2169–2180 (2007).

VII. Referências bibliográficas

25. Ohashi, K., Shibata, R., Murohara, T. & Ouchi, N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 348–355 (2014).
26. Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. & Walsh, K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 561–566 (2003).
27. Lynch, F. M. *et al.* Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses. *Am J Physiol Hear. Circ Physiol* **304**, H786-95 (2013).
28. Hui, X., Lam, K. S., Vanhoutte, P. M. & Xu, A. Adiponectin and cardiovascular health: An update. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 574–590 (2012).
29. Sena, C. M., Pereira, A., Fernandes, R., Letra, L. & Seiça, R. M. Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: Role of perivascular adipose tissue. *Br. J. Pharmacol.* (2017). doi:10.1111/bph.13756
30. Gil-Ortega, M. *et al.* Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
31. Maruyama, S. *et al.* Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **287**, 408–417 (2012).
32. Hernández-Díaz, A., Arana-Martínez, J. C., Carbó, R., Espinosa-Cervantes, R. & Sánchez-Muñoz, F. Omentina: papel en la resistencia a la insulina, inflamación y protección cardiovascular. *Arch. Cardiol. México* **86**, 1–11 (2015).
33. Yang, R.-Z. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action. *AJP Endocrinol. Metab.* **290**, 1253–1261 (2006).
34. Catoi, A. F. Increased Chemerin and Decreased Omentin-1 Levels in Morbidly Obese Patients Are Correlated With Insulin Resistance, Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *Clujul Med.* **87**, 19–26 (2014).

VII. Referências bibliográficas

35. Britton, K. A. & Fox, C. S. Perivascular adipose tissue and vascular disease. *Clin. Lipidol.* **6**, 79–91 (2011).
36. Szasz, T. & Webb, R. C. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin. Sci.* **122**, 706–721 (2014).
37. Brown, N. K. *et al.* Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: A review of current research and animal models. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **34**, (2014).
38. Padilla, J., Jenkins, N. T., Vieira-Potter, V. J. & Laughlin, M. H. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**, R543-52 (2013).
39. Fernández-Alfonso, M. S. *et al.* Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. *International Journal of Endocrinology* (2013). doi:10.1155/2013/402053
40. Yudkin, J. S., Eringa, E. & Stehouwer, C. D. A. 'Vasocrine' signalling from perivascular fat: A mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet* **365**, 1817–1820 (2005).
41. Lee, M. H. H., Chen, S. J., Tsao, C. M. & Wu, C. C. Perivascular adipose tissue inhibits endothelial function of rat aortas via caveolin-1. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
42. Viridis, A. Endothelial Dysfunction in Obesity: Role of Inflammation. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* 1–3 (2016). doi:10.1007/s40292-016-0133-8
43. Omar, A., Chatterjee, T. K., Tang, Y., Hui, D. Y. & Weintraub, N. L. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1631–1636 (2014).
44. Miao, C. & Li, Z. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 643–658 (2012).
45. Sena, C. M., Pereira, A. M. & Seica, R. Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1832**, 2216–2231 (2013).

VII. Referências bibliográficas

46. Dai, D. Z. & Dai, Y. Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities. *Vasc Heal. Risk Manag* **6**, 787–794 (2010).
47. Félétou, M. The Endothelium - Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells - Focus on vasoactive endothelium-derived mediators. *San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences* (2011).
48. Su, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J. Cardiol.* **7**, 719–41 (2015).
49. Huang, P. L. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr. Hypertens Rep* **5**, 473–80 (2003).
50. Willerson, J. T. & Kereiakes, D. J. Endothelial Dysfunction. *Circulation* **108**, 2060–2061 (2003).
51. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes* **54**, 1615–1625 (2005).
52. Nègre-salvayre, A., Augé, N., Pamplona, R., Portero-otín, M. & Salvayre, R. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, (2009).
53. Li, H., Li, H., Bao, Y., Zhang, X. & Yu, Y. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor- κ B pathway in rat aorta. *Int. J. Cardiol.* **152**, 218–224 (2011).
54. Bays, H., Mandarino, L. & DeFronzo, R. A. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 463–478 (2004).
55. Kalupahana, N. S., Moustaid-Moussa, N. & Claycombe, K. J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* **33**, 26–34 (2012).

VII. Referências bibliográficas

56. Hartell, N. A., Archer, H. E. & Bailey, C. J. Insulin-stimulated endothelial nitric oxide release is calcium independent and mediated via protein kinase B. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 781–790 (2005).
57. Movassat, J. *et al.* Type 2 diabetes - A matter of failing β -cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes, Obes. Metab.* **9**, 187–195 (2007).
58. Hariri, N. & Thibault, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr. Res. Rev.* **23**, 270–299 (2010).
59. Clegg, D. J. *et al.* Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol. Behav.* **103**, 10–16 (2011).
60. Shang, W. *et al.* Effect of high dietary fat on insulin secretion in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. *Pancreas* **25**, 393–9 (2002).
61. Zaman, M.-Q. *et al.* Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high-fat or high-fructose diets. *Br. J. Nutr.* **106**, S206–S210 (2011).
62. Lapointe, M. *et al.* Omentin changes following bariatric surgery and predictive links with biomarkers for risk of cardiovascular disease. *Cardiovasc. Diabetol.* **13**, 124 (2014).
63. Jaikanth, C. *et al.* Emergence of Omentin as a Pleiotropic Adipocytokine. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 377–383 (2013).
64. Auberval, N. *et al.* Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetol. Metab. Syndr.* **6**, 130 (2014).
65. Riccardi, G., Giacco, R. & Rivellese, a. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* **23**, 447–56 (2004).
66. Cheng, Z. J. *et al.* Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension* **37**, 433–9 (2001).
67. Yan, T., Wang, S., Man, Y., Shan, L. & Wa, Y. Impairment of the vascular relaxation and differential expression of caveolin-1 of the aorta of diabetic + db / + db mice. *Eur. J. Pharmacol.* **546**, 134–141 (2006).

VII. Referências bibliográficas

68. Denninger, J. W. & Marletta, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1411**, 334–350 (1999).
69. Muniyappa, R. & Sowers, J. R. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 5–12 (2013).
70. Worthley, M. I. *et al.* The Deleterious Effects of Hyperglycemia on Platelet Function in Diabetic Patients With Acute Coronary Syndromes. Mediation by Superoxide Production, Resolution With Intensive Insulin Administration. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 304–310 (2007).
71. Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R. D., Greenstein, A. S. & Heagerty, A. M. Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *J. Vasc. Res.* **52**, 299–305 (2016).
72. Zaborska, K. E., Wareing, M., Edwards, G. & Austin, C. Loss of anti-contractile effect of perivascular adipose tissue in offspring of obese rats. *Int. J. Obes.* **40**, 1205–1214 (2016).
73. Pérez, L. M. *et al.* ‘Adipaging’: Aging and obesity share biological hallmarks related to a dysfunctional adipose tissue. *J. Physiol.* **12**, 3187–3207 (2016).
74. Förstermann, U. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cardiovascular Disease and its Pharmacological Reversal. *Nitric Oxide* 139–167 (2010). doi:10.1016/B978-0-12-373866-0.00005-8
75. Chirkov, Y. Y. & Horowitz, J. D. Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide : A new therapeutic frontier ? *Pharmacol. Ther.* **116**, 287–305 (2007).