



2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**O papel do metilglicoxal nas adaptações
metabólicas do tecido adiposo quando
sujeito a uma redução parcial da irrigação**

Tiago Rodrigues

2013

O papel do metilglicoxal nas adaptações metabólicas do tecido adiposo quando
sujeito a uma redução parcial da irrigação

Tiago Rodrigues



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O papel do metilglioal nas adaptações
metabólicas do tecido adiposo quando sujeito a
uma redução parcial da irrigação

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Raquel Seica no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), da Faculdade de Medicina e da Professora Doutora Emília Duarte da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.

Tiago Rodrigues

2013

Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Raquel Seiça, gostaria de exprimir toda a minha gratidão pelo seu apoio, estima e ajuda diária. Importa lembrar que, desde o primeiro dia, senti o seu incentivo, o seu carácter sublime, mas principalmente a sua amizade. Deu-me toda a liberdade de escolha, mas também confiança e força, que procurei retribuir com empenho e dedicação ao longo destes meses. Reconheço e valorizo todas as ajudas recebidas, de variadíssimas formas, bem como a árdua tarefa de corrigir este manuscrito, sendo que as suas sugestões conferiram, notoriamente, maior rigor, exactidão e clareza. Por tudo isto, foi claramente um prazer fazer este percurso sob a sua orientação, esperando sinceramente, que o futuro permita a sua persecução.

À minha co-orientadora no DCV da FCTUC, a Professora Doutora Emília Duarte, agradeço toda a sua disponibilidade, ajuda e recomendação, bem como a aceitação como seu aluno.

Ao agora Doutor, de seu nome Paulo Matafome, resta-me tentar expressar toda a gratidão, estima, reconhecimento e amizade que nutro por ele e que fui adquirindo ao longo destes tempos. É nos pormenores que os grandes Homens se definem, mas com tanta capacidade e espírito de ajuda, fica difícil encontrar esses mesmos pormenores em detrimento de tanta virtude, entejuda e paciência para comigo. Os tempos são difíceis, mas são também um desafio às tuas capacidades e aos teus valores, que tão bem reconheço e valorizo, esperando sinceramente, que o futuro a curto prazo te beneficie como tu tanto mereces. A nossa amizade fica para a vida, mas espero também ter a oportunidade de evoluir e continuar a teu lado e assim almejar a capacidade de retribuir todo o bem que me fizeste.

A todas as pessoas da Fisiologia, gostaria de expressar o meu agradecimento, uma vez que cada uma, à sua maneira, estimularam a minha evolução e fizeram-me sentir bem no seio deste grupo. As críticas, ora construtivas, ora menos construtivas, também serviram o seu propósito e ajudaram à minha evolução pessoal e profissional.

A todos os meus amigos, seria injusto particularizar, certeza porém, que também não é justo para alguns não o fazer. Saibam que foram fulcrais e que me sinto um sortudo em ter tantos e tão bons amigos, que ficarão claramente para a vida. Quem ler estas palavras e sentir uma emoção, um ligeiro arrepio, ou até mesmo uma brisa, deverá sentir o seu papel na minha vida, mas também o meu sincero agradecimento por todos os momentos, ajudas e vivências partilhadas. Esta conquista também é vossa, deixando também claro, que estarei sempre aqui ao vosso dispor.

Gostaria de terminar com um enorme agradecimento aos meus pais, irmão e restante família, dedicando-lhes este percurso, uma vez que, sem vocês nada disto tinha sido possível. Mesmo sem saberem muito bem o que faço, o apoio foi constante, aumentando assim o meu espírito de sacrifício para enfrentar as dificuldades do dia-a-dia.

Publicações resultantes:

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seça R. Reduction of methylglyoxal-induced glycation by pyridoxamine improves adipose tissue microvascular lesions. **Journal of Diabetes Research**. 2013; 690650.
doi: 10.1155/2013/690650.

Rodrigues T, Matafome P, Seça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. **Archives of Physiology & Biochemistry** (submetido).

Resumos alargados publicados em actas de encontros científicos:

Rodrigues T, Matafome P, Seça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. **European Journal of Clinical Investigation**, 2013; 43.

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seça R. Pyridoxamine reduces the microvascular effects of methylglyoxal-induced glycation in adipose tissue. **European Journal of Clinical Investigation**, 2013; 43.

Rodrigues T, Matafome P, Seça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, 2012; 7(2).

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seça R. Pyridoxamine reduces the microvascular effects of methylglyoxal-induced glycation in adipose tissue **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, 2012; 7(2).

Rodrigues T, Matafome P, Seça R. O metilglioxal potencia as alterações no metabolismo do tecido adiposo depois de uma redução parcial do fluxo sanguíneo **Revista Portuguesa de Diabetes**, 2013; 8(1).

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seiça R. A piridoxamina reduz os efeitos microvasculares da glicação induzida por metilglioxal no tecido adiposo. **Revista Portuguesa de Diabetes**, 2013; 8(1).

Matafome P, **Rodrigues T**, Sena C, Seiça R. Sinalização do tecido adiposo após perda parcial da irrigação num modelo de glicação induzida por metilglioxal. **Revista Portuguesa de Diabetes**, 2013; 8(1).

Comunicações orais em encontros científicos/revistas indexadas:

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seiça R. Pyridoxamine reduces the microvascular effects of methylglyoxal-induced glycation in adipose tissue. **XIV Congresso Português de Endocrinologia**, Porto, Portugal, 24-27 de Janeiro, 2013.

Rodrigues T, Matafome P, Seiça R. O metilglioxal potencia as alterações no metabolismo do tecido adiposo depois de uma redução parcial do fluxo sanguíneo. **Reunião da Sociedade Portuguesa de Diabetologia**, Tomar, Portugal, 1 e 2 de Março de 2013.

Apresentações em painel de encontros científicos nacionais e internacionais:

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seíça R. Pyridoxamine reduces the microvascular effects of methylglyoxal-induced glycation in adipose tissue. 2nd PF2MUC Symposium-Changing Paradigms of Science e Dia da Faculdade de Medicina, Coimbra, Portugal, October 26, 2012.

Rodrigues T, Matafome P, Seíça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. IV Annual Meeting of IBILI, Coimbra, Portugal, December 6-7, 2012.

Rodrigues T, Matafome P, Seíça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. XIV Congresso Português de Endocrinologia, Porto, Portugal, 24-27 de Janeiro, 2013.

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seíça R. Pyridoxamine reduces the microvascular effects of methylglyoxal-induced glycation in adipose tissue. XIV Congresso Português de Endocrinologia, Porto, Portugal, 24-27 de Janeiro, 2013.

Rodrigues T, Matafome P, Seíça R. O metilglioxal potencia as alterações no metabolismo do tecido adiposo depois de uma redução parcial do fluxo sanguíneo. Reunião da Sociedade Portuguesa de Diabetologia, Tomar, Portugal, 1 e 2 de Março de 2013.

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seíça R. A piridoxamina reduz os efeitos microvasculares da glicação induzida por metilglioxal no tecido adiposo. Reunião da Sociedade Portuguesa de Diabetologia, Tomar, Portugal, 1 e 2 de Março de 2013.

Rodrigues T, Matafome P, Seíça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. 47th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 17 a 20 de Abril de 2013.

Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena CM, Seíça R. Pyridoxamine reduces the microvascular effects of methylglyoxal-induced glycation in adipose tissue. 47th Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 17 a 20 de Abril de 2013.

ÍNDICE

Lista de figuras.....	XI
Lista de tabelas.....	XIV
Lista de abreviaturas.....	XV
Resumo.....	XVII
Abstract.....	XIX
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Considerações gerais – diabetes tipo 2.....	2
1.2 Toxicidade da glicose – <i>stress</i> oxidativo e AGEs.....	5
1.2.1. <i>Stress</i> oxidativo.....	6
1.2.2. Glicação.....	8
1.2.3. Metilglioxal.....	10
1.3 Tecido adiposo – funções e mecanismos de desregulação.....	11
1.3.1. Funções do tecido adiposo.....	12
1.3.2. Disfunção do tecido adiposo.....	15
1.4 Questões a esclarecer.....	24
CAPÍTULO 2. OBJECTIVOS.....	2
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
3.1. Reagentes utilizados.....	4
3.2. Modelos animais.....	4
3.3. Análises <i>in vivo</i>	7
3.4. Determinação dos níveis de proteínas no tecido adiposo epididimal - <i>Western Blotting</i>	9
3.5. Histologia do tecido adiposo epididimal.....	11
3.6. Imunohistoquímica de tecido adiposo epididimal.....	12
3.7. Análise estatística.....	14
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	16
4.1. Quantificação da redução do fornecimento sanguíneo ao tecido adiposo epididimal esquerdo.....	16

4.2. Avaliação da indução de glicação no tecido adiposo epididimal pela administração de metilglioxal	17
4.3. Efeitos da administração de MG durante 8 semanas no peso corporal, na tolerância à glicose e hemoglobina glicada e no colesterol total	19
4.4. Marcadores sistêmicos 48 horas após uma redução parcial da irrigação. 19	
4.5. Sinalização do tecido adiposo epididimal após uma redução parcial da irrigação durante 1 hora	22
4.6. Sinalização do tecido adiposo epididimal após redução parcial da irrigação durante 48 horas	27
CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO	35
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

Lista de figuras

Figura 1: Aumento da concentração intracelular de glicose, associado às vias implicadas na resposta inflamatória, no *stress* oxidativo e dano celular e na modificação da expressão génica.....7

Figura 2: Esquema integrativo dos diferentes mecanismos que compõem a fisiologia do tecido adiposo.....14

Figura 3: Esquema integrativo dos dois principais factores de desregulação do tecido adiposo, e dos mecanismos fisiológicos de resposta decorrentes da activação de vias inflamatórias.....15

Figura 4: Modelo representativo da expansão do tecido adiposo, com focos de hipoxia quando a angiogénese não acompanha de uma forma eficaz a hipertrofia dos adipócitos e a expansão do tecido.....18

Figura 5: Modelo de indução de angiogénese, na presença ou na ausência de elevadas concentrações de glicose.....20

Figura 6: Esquema representativo da hipertrofia do adipócito e o conseqüente aparecimento de focos de hipoxia e desregulação do tecido adiposo, com infiltração de macrófagos e alteração do seu secretoma.....22

Figura 7: Esquema integrativo do *feed-back* existente entre a microvasculatura e o tecido adiposo hipertrófico, com os vários factores de crescimento e quimioatractivo representados.....25

Figura 8: Diagrama representativo dos grupos de estudo e as respectivas condições, com laqueação de vasos durante 1 hora.....31

Figura 9: Diagrama representativo dos grupos de estudo e as respectivas condições, com laqueação de vasos durante 48 horas.....	32
Figura 10: Quantificação do corante <i>Evans Blue</i> no tecido adiposo epididimal e respectivas figuras representativas.....	42
Figura 11: Quantificação por <i>Western Blotting</i> do marcador de glicação CEL no tecido adiposo epididimal e respectivas figuras representativas (A). Marcação histológica de materiais glico-conjugados (PAS) (B) e de componentes fibróticos (TM) no tecido adiposo epididimal (C).....	43
Figura 12: Níveis sistémicos de glicose e insulina.....	45
Figura 13: Quantificação espectrofotométrica dos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres e dos níveis sistémicos de triglicérideos.....	46
Figura 14: Níveis séricos de adiponectina.....	47
Figura 15: Expressão de ERK1/2 e P-ERK1/2 no tecido adiposo epididimal, quantificada por <i>Western Blotting</i>	48
Figura 16: Expressão de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ no tecido adiposo epididimal, quantificada por <i>Western Blotting</i>	49
Figura 17: Expressão de Akt total e P-Akt no tecido adiposo epididimal, quantificada por <i>Western Blotting</i>	50
Figura 18: Expressão de Perilipina A no tecido adiposo epididimal, quantificada por <i>Western Blotting</i>	51

Figura 19: Expressão de CD31 no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.....53

Figura 20: Expressão de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.54

Figura 21: Expressão de Akt, P-Akt no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.55

Figura 22: Expressão de VEGF no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.....56

Figura 23: Expressão de $\text{PPAR}\gamma$ no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.....57

Figura 24: Expressão de Perilipina A no tecido adiposo epididimal quantificada por *Western Blotting* (A), bem como figuras ilustrativas da presença de Perilipina A, por imunohistoquímica (B).....58

Lista de tabelas

Tabela I: Soluções utilizadas na técnica de *Western Blotting*.....36

Tabela II: Peso corporal, glicemia 2 horas após administração i.p de glicose (1,8 g/kg), hemoglobina glicada e níveis séricos de colesterol total.....44

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AGLs	Ácidos gordos livres
Akt	<i>Activated protein kinase B</i>
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
Ang	Angiopietina
aP-2	Proteína adaptadora
ARNT	Hidrocarboneto translocador do receptor nuclear
CCR	Receptor de citocinas
CEL	Carboxietil-lisina
CPE	Células progenitoras do endotélio
CXCR	Receptor do factor derivado do estroma
eNOS	Sintetase do óxido nítrico
ERK	<i>Extracellular- regulated kinase</i>
FATP	Proteína transportadora de ácidos gordos
FELASA	Federação Europeia das Associações Científicas de Experimentação Animal
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GK	Goto-kakizaki
GLUT	Transportador de glicose
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF	Factor induzido pela hipoxia
HRE	Genes de resposta à hipoxia
HSL	Lipase hormono-sensitiva
ICAM	<i>Intercellular cell adhesion molecule</i>
IGF-1	<i>Insulin- like growth factor</i>
IKK β	Proteína cinase do I κ B

Lista de abreviaturas

IL	Interleucina
IRS	Substrato do receptor da insulina
I κ B α	Proteína inibitória do factor de transcrição NF- κ B
JNK	<i>Stress activated protein kinase/Jun-amino-terminal kinase</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
MAPK	<i>Mitogen- activated protein kinase</i>
MCP-1	factor quimioatractivo de monócitos-1
MG	Metilglioxal
MMP	Metaloproteinases da matriz extracelular
NF	Factor nuclear
NOXs	Enzimas oxidativas
PAI	Inibidor do activador do plasminogénio
PARP	<i>Poly ADP ribose polymerase</i>
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PK	Proteína cinase
PPAR	Receptor activador da proliferação do peroxissoma
RAGE	Receptor dos AGEs
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
SDF-1	<i>Stromal-derived factor-1</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Tie	Receptor de angiopoietinas
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TM	Tricrómio de Masson
TNF- α	Factor de necrose tumoral- α
UCP	Proteína desacopladora
uPA	activador do plasminogénio
VEGF	Factor de crescimento do endotélio vascular
VEGFR	Receptor do factor de crescimento do endotélio vascular

Resumo

Introdução e objetivos: A disfunção do tecido adiposo resulta primariamente de uma acumulação lipídica incorrecta e hipoxia, que se pode reflectir numa inadequada adipogénese e angiogénese. A adaptação metabólica e angiogénica do tecido adiposo à hipoxia influencia a sua capacidade para lidar com lípidos e glicose circulantes, podendo assim afectar marcadores metabólicos a nível sistémico. O nosso grupo demonstrou recentemente que a glicação induzida por metilglioxal (MG) pode levar a uma diminuição da irrigação e alterações funcionais, normalmente observadas em modelos de desregulação metabólica. Baseado nestes resultados foi nosso objectivo avaliar o papel do MG nas adaptações metabólicas causadas por um decréscimo do fornecimento sanguíneo ao tecido adiposo epididimal, uma condição frequentemente observada em indivíduos obesos.

Métodos: Um grupo de ratos *Wistar* com seis meses foi tratado diariamente com MG (WM, n=12), durante 8 semanas (75 mg/Kg/dia, diluído na água). Em seguida, ratos (W; WM: n=12) foram usados como controlos (n=4), e, os restantes (n=8) submetidos a laqueação de vasos sanguíneos no tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 e 48 horas (Wi 1h; WMi 1h; Wi 48h; WMi 48h: n=4/grupo). O tecido adiposo epididimal direito foi usado como controlo interno da experiência (Wc 1h; WMc 1h; Wc 48h; WMc 48h: n=4/grupo). 48 horas após a cirurgia e depois de um período de jejum de 6 horas, foram avaliados os níveis sanguíneos de glicose, lípidos e insulina.

Resultados: Uma injeção i.v. de *Evans Blue* após o procedimento cirúrgico foi o método escolhido para quantificar o fornecimento sanguíneo ao tecido adiposo epididimal, estando a marcação significativamente diminuída 5 minutos depois, em comparação ao controlo interno. Com 1 hora de redução parcial da irrigação, os ratos sujeitos ao MG mostraram uma maior activação da ERK1/2, e da degradação de I κ B α e menores níveis de Akt total e Perilipina A. Após 48 horas de redução da irrigação, os ratos mostraram aumentos significativos de glicose, insulina, ácidos gordos livres e triglicéridos, bem como menores níveis de adiponectina. Também no tecido adiposo epididimal parcialmente isquémico dos ratos sujeitos à administração de MG, foram menores as expressões de I κ B α , inibidor da via do NF- κ B, de PPAR γ e Perilipina A.

Conclusões: Em conjunto, os nossos resultados sugerem que a acumulação de MG pode levar a uma diminuição da capacidade do tecido adiposo se adaptar à hipoxia, causando alterações metabólicas que se podem reflectir a nível sistémico.

Palavras-chave: Tecido adiposo, Microcirculação, Metilglioxal, Metabolismo.

Abstract

Introduction and objectives: Adipose tissue dysfunction results primarily from impaired lipid storage and hypoxia, what may reflect defects of adipogenesis and angiogenesis. Metabolic and angiogenic adaptation of adipose tissue to hypoxia influences its ability to cope with circulating lipids and glucose and thus may affect the systemic metabolic markers. Our group recently showed that glycation induced by methylglyoxal (MG) may lead to decreased irrigation and functional alterations commonly observed in models of metabolic dysregulation. Based on that, our goal was now to study the role of MG in the metabolic adaptations caused by a decrease of blood supply in adipose tissue, a condition commonly observed in obese individuals.

Methods: One group of Wistar rats was treated daily with methylglyoxal (WM) during 8 weeks (75 mg/Kg/day, diluted in water). After this time, the rats (W; WM: n=12) were used as control (n=4/group) as the others (n=8) were used for surgery-induced vessel block of the left epididymal adipose tissue during 1 and 48 hours (Wi 1h; WMi 1h; Wi 48h; WMi 48h: n=4/group). The right epididymal adipose tissue was used as an internal control of the experiment (Wc 1h; WMc 1h; Wc 48h; WMc 48h: n=4/group). 48 hours after surgery, glycemia, lipids and insulin were measured after 6 hours fasting.

Results: Evans Blue i.v. injection after surgery was used to measure blood supply in adipose tissue and the staining was significantly decreased 5 minutes after injection, when comparing with the internal control. 1 hour of partial reduction of blood supply, MG-treated rats had higher levels of ERK1/2 activation, as well as, more I κ B α degradation and lower levels of total Akt and Perilipin A. In addition, 48 hours after surgery all rats showed increased fasting glucose and insulinemia. However, MG-treated rats had higher levels of free fatty acids and triglycerides and decreased adiponectin levels. As well, the partially ischemic adipose tissue of MG-treated rats showed decreased levels of I κ B α , an inhibitor of NF- κ B pathway, and decreased levels of PPAR γ .

Conclusions: Altogether, our results suggest that MG accumulation may lead to a decreased ability of adipose tissue to adapt to hypoxia, causing metabolic alterations that may be reflected at the systemic level.

Keywords: Adipose tissue, Microcirculation, Methylglyoxal, Metabolism.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO**1.1 Considerações gerais – diabetes tipo 2**

A diabetes tipo 2 é uma doença crónica, multifactorial e progressiva responsável pela mortalidade e morbidade de 8 % da população mundial, constituindo, por conseguinte, um grave problema de saúde pública e económico em todo o mundo (Hogan et al., 2003; Negre-Salvayre et al., 2009; Ismail-Beigi., 2012). O número de pessoas com diabetes tipo 2 cresce a cada ano, em resposta a diversos factores, tais como: crescimento populacional, envelhecimento, sedentarismo e obesidade das populações (Shaw et al., 2010). Estima-se que o número de doentes com diabetes tipo 2 (20 aos 79 anos de idade) sofra um incremento de aproximadamente 285 milhões em 2010, para 439 milhões em 2030, havendo um aumento de 69% e 20%, em países em desenvolvimento e desenvolvidos, respectivamente (Shaw et al., 2010; Ismail-Beigi., 2012).

A diabetes tipo 2 é uma doença metabólica complexa e heterogénea, caracterizada por deficiente secreção de insulina e resistência dos tecidos insulino-dependentes à sua acção, nomeadamente o tecido adiposo, o fígado e o músculo. Em consequência, ocorre um aumento característico da concentração de glicose na corrente sanguínea, de uma forma crónica, sendo este aumento responsável pelo aparecimento de diversas complicações agudas e crónicas (Negre-Salvayre et al., 2009; Ismail-Beigi., 2012). Para além da componente genética, os factores ambientais têm um papel preponderante no aparecimento da diabetes tipo 2 e na sua posterior evolução (Virkamäki et al., 1999; Feinglos & Bethel., 2008).

Em estádios iniciais, o desenvolvimento de insulino-resistência, hepática e periférica, leva a um aumento compensatório na produção de insulina por parte das células β pancreáticas, uma vez que, a concentrações normais, a insulina não exerce eficazmente os seus efeitos. De facto, para que ocorra a captação de glicose pelas células, a insulina terá de ser libertada em quantidades superiores, de maneira a suplantar a resistência dos tecidos à sua acção (Bugianesi et al., 2005; Kawahito., 2009; Benito., 2011). Na presença de defeitos primários da célula β , esta compensação é insuficiente, de que resulta um aumento da glicemia. Devido a fenómenos de glico e lipotoxicidade, a capacidade de produção de insulina pelas células β diminui ainda mais, o que agrava a hiperglicemia (Turner et al., 1998; Kawahito., 2009; Negre-Salvayre et al., 2009). Gera-se, assim, um ciclo que pode levar à falência das células β , em simultâneo com o progressivo aumento da resistência dos tecidos à acção da insulina (Kawahito., 2009).

O fígado é um importante órgão na homeostase da glicose. Como tal, dependendo das necessidades do organismo, sintetiza e liberta glicose para o sangue quando esta diminui (por exemplo em jejum através da gliconeogénese e da glicogenólise) ou acumula-a na forma de glicogénio quando aumenta (após as refeições). A insulina tem uma acção primordial na inibição da gliconeogénese e da glicogenólise e, como tal, na inibição da produção hepática de glicose. Na presença de insulino-resistência e inadequada secreção de insulina, ocorre uma produção contínua de glicose pelo fígado com a subsequente libertação da mesma para a corrente sanguínea e hiperglicemia (Natali et al., 2000; Bugianesi et al., 2005). A insulina é uma hormona com diversas funções nos tecidos periféricos, nomeadamente estimulando o transportador da glicose (GLUT 4) no músculo e no tecido adiposo, de que resulta uma maior captação de glicose da corrente sanguínea de acordo com o gradiente (Bugianesi et al., 2005; Plum et al., 2006). A redução destes efeitos conduz, também, a hiperglicemia.

A hiperglicemia na diabetes tipo 2 predispõe as células a um aumento do *stress* oxidativo pela maior produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e à acção tóxica da própria glicose (açúcar redutor). As ROS, além de estarem envolvidas na diminuição da síntese e da libertação de insulina pelas células β , afectam também outras células através da inibição de enzimas da via glicolítica (GAPDH), que se traduz numa maior acumulação dos intermediários desta via. São estes intermediários altamente reactivos que activam várias vias intracelulares responsáveis pelo desenvolvimento das complicações diabéticas (Brownlee., 2005; Houstis et al., 2006; Kawahito., 2009). As reacções não enzimáticas decorrentes da interacção dos intermediários glicolíticos e as biomoléculas do organismo (glicação) são particularmente importantes na activação de vias inflamatórias e de *stress* e, conseqüentemente, na disfunção celular (Goldin et al., 2006; Negre-Salvayre et al., 2009).

A longo prazo, a hiperglicemia e as alterações do metabolismo celular dos hidratos de carbono originam danos em vários tecidos, nomeadamente pela maior exposição das células ao *stress* oxidativo e à glicação, com activação de diversas vias intracelulares que culminam em relevantes complicações macrovasculares (doença aterosclerótica e doença vascular periférica) e microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia) (Turner et al., 1998; Brownlee., 2001; Voziyan & Hudson., 2005).

Sendo múltiplos os factores envolvidos, torna-se difícil determinar os mecanismos moleculares que estão associados às complicações da diabetes tipo 2. Por outro lado, os estudos realizados são maioritariamente efectuados em linhas celulares e roedores, pelo que a extrapolação para o Homem deve ser cautelosa (Guilherme et al., 2008).

1.2 Toxicidade da glicose – *stress* oxidativo e AGEs

A homeostase da glicose no organismo é mantida graças à interacção de três processos fisiológicos: secreção de insulina pelas células β pancreáticas, captação de glicose pelos tecidos hepático e periférico, e pela produção/armazenamento de glicose no fígado. É fundamental a manutenção da normoglicemia para que as células possam utilizar a glicose, de forma adequada, como fonte de energia, sendo a concentração da glicose particularmente regulada pela insulina. Outras hormonas, como a glucagina, as catecolaminas, o cortisol e a hormona do crescimento, opõem-se à acção de insulina na glicemia, nomeadamente nos períodos interdigestivos e no jejum (Kawahito., 2009; Triplitt., 2012). A perda do balanço entre a absorção no intestino, o consumo pelos tecidos (glicólise, via das pentoses-fosfato, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e síntese de glicogénio) e a produção hepática (gliconeogénese e glicogenólise) conduz a alterações da homeostase da glicose (Kawahito., 2009; Ismail-Beigi., 2012).

Os danos que advêm da hiperglicemia crónica são fulcrais na evolução da diabetes mellitus e afectam sobretudo certos tipos de células que: 1) não são capazes de controlar a concentração da glicose ou seja, a entrada de glicose dá-se por gradiente químico, e possuem uma menor expressão de GLUT4 estando, como tal, sujeitas à acção tóxica da glicose (células endoteliais vasculares; células mesangiais renais; neurónios e neuroglia; células β); 2) geram grandes quantidades de ROS e de produtos avançados de glicação (AGEs), induzindo um estado de *stress* oxidativo e glicação (Brownlee., 2005; Goldin et al., 2006; Negre-Salvayre et al., 2009).

1.2.1. Stress oxidativo

As ROS formam-se a nível intracelular em diferentes tecidos por diversas reacções, tais como glicação, cadeia transportadora de electrões e enzimas oxidativas (NOXs), tendo assim um papel importante no desenvolvimento da diabetes tipo 2 e suas complicações crónicas (Negre-Salvayre et al., 2009; Kaneto et al., 2010). As ROS podem também ter origem exógena em relação, por exemplo, com o tipo de alimentos ingeridos e o tipo de confecção utilizado (Klaunig et al., 2011).

Os sistemas anti-oxidantes celulares são compostos por moléculas de baixo peso molecular (ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, biliverdina redutase, monóxido de carbono, tocoferol e glutathione reduzida) e enzimas anti-oxidantes (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase, heme-oxidase e catalases), e têm por objectivo manter a homeostase da oxidação/redução no meio intracelular, protegendo assim a célula e as suas biomoléculas (Negre-Salvayre et al., 2009; Desai et al., 2010). Numa situação em que a actividade do sistema anti-oxidante não consegue suplantar a formação de ROS, estamos perante um desequilíbrio, que se denomina *stress oxidativo*. Na diabetes tipo 2 ocorre uma maior produção das ROS, por oxidação da glicose, disfunção mitocondrial, via dos polióis e produtos avançados de glicação, e o sistema anti-oxidante tem a sua acção diminuída (Houstis et al., 2006; Newsholme et al., 2007; Negre-Salvayre et al., 2009; Kaneto et al., 2010).

Os efeitos da hiperglicemia na diabetes tipo 2, particularmente a nível dos microvasos, ocorrem por quatro vias fundamentais: dos polióis, dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), da proteína cinase C (PKC) e da hexosamina. Todas estas vias possuem em comum o aumento dos níveis de ROS, provocando assim um aumento do *stress oxidativo* (figura 1) (Brownlee., 2005; Negre-Salvayre et al., 2009).

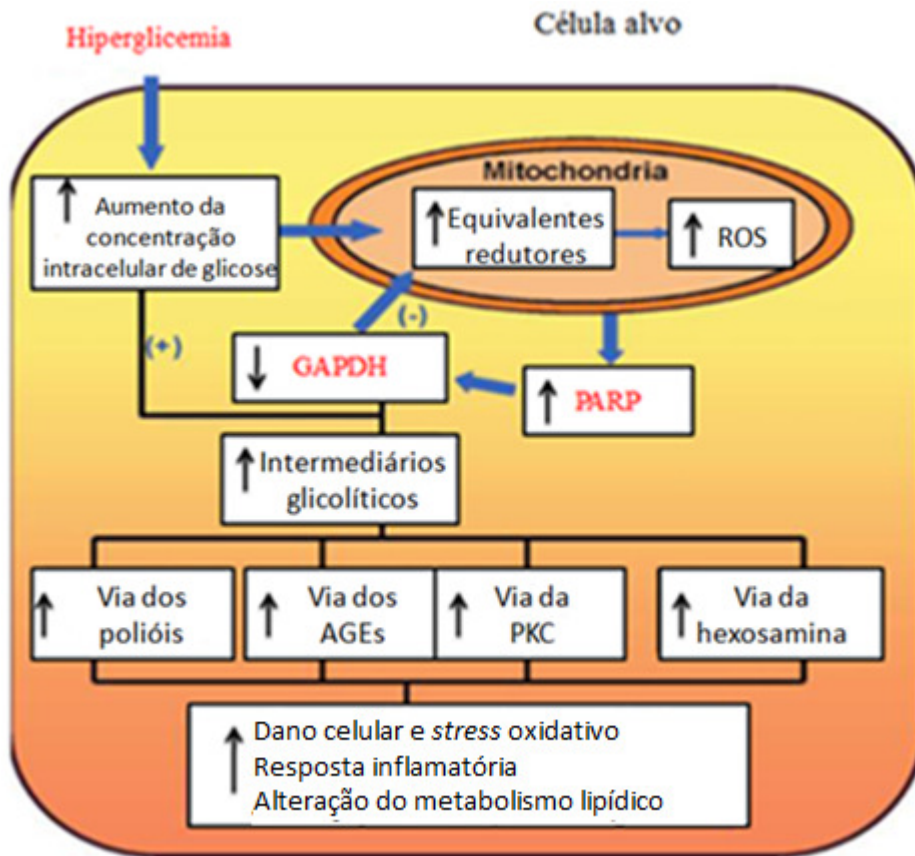


Figura 1 – Aumento da concentração intracelular de glicose, associado às vias implicadas na resposta inflamatória, no *stress* oxidativo e dano celular e na modificação da expressão génica.

(ROS), espécies reactivas de oxigénio; (GAPDH), gliceraldeído fosfato desidrogenase; (PARP), poly ADP ribose polymerase; (AGEs), produtos finais de glicação avançada; (PKC), via da proteína cinase C. (Adaptado de Negre-Salvayre et al., 2009).

1.2.2. Glicação

A glicação, também designada como glicosilação não-enzimática, foi descrita pela primeira vez por L. Maillard, no século XX (Maillard., 1912). Esta reacção não-enzimática ocorre na presença de açúcares redutores (glicose, frutose, entre outros) que possuem a capacidade de reagir com os grupos amina de diversas moléculas biológicas, como proteínas, ácidos nucleicos e lípidos (Brownlee., 2005; Goldin et al., 2006; Negre-Salvayre et al., 2009). Estas moléculas, ao sofrerem glicação, alteram as suas propriedades físicas e químicas, bem como a sua função biológica, podendo assim levar a alterações intra e extracelulares. Os processos de glicação e oxidação ocorrem através de um conjunto de reacções complexas e rearranjos moleculares posteriores, com origem nas bases de Schiff, transição a produtos Amadori e, finalmente, formação de AGEs (Goldin et al., 2006; Negre-Salvayre et al., 2009). A formação destes compostos a partir de precursores dicarbonílicos intracelulares é menor do que a partir da glicose; contudo, é frequente a sua formação por fragmentação de gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato a metilglioxal (MG) ou, então, por autooxidação da glicose a glioxal, seguindo-se as transições e rearranjos através de bases de Schiff e produtos Amadori (cetoaminas e frutosaminas) (Negre-Salvayre et al., 2009; Desai et al., 2010). Quanto maior for a concentração de açúcares redutores no organismo maior será a taxa de glicação das biomoléculas, situação relacionada com a hiperglicemia e, por conseguinte, com a diabetes tipo 2 (Brownlee., 2001; Brownlee., 2005).

Os AGEs contribuem para as complicações diabéticas, de duas formas: 1) através da formação de ligações cruzadas permanentes com moléculas-chave da matriz extracelular, alterando a sua estrutura; 2) por interacção com o seu receptor RAGE na superfície celular. Os AGEs conseguem alterar as propriedades das principais proteínas da matriz (colagénio, vitronectina e laminina), ligando-as a outras macromoléculas (ligações AGE-AGE), causando a sua perda de função e maior rigidez da matriz. Por outro lado, a glicação leva à síntese de diferentes tipos de colagénio, laminina e fibronectina, normalmente associada a um aumento da expressão de *transforming growth factor- β* (TGF- β). A interacção dos AGEs com os receptores RAGE induz múltiplas alterações celulares, nomeadamente a nível de células endoteliais, musculares e macrófagos, através da activação de diferentes vias/mecanismos (Brownlee., 2005; Goldin et al., 2006; Negre-Salvayre et al., 2009). A nível intracelular, os AGEs formam-se mais lentamente na presença de glicose do que na presença de outros açúcares intracelulares contribuindo, no entanto, para a activação de vias intracelulares de inflamação e *stress* (Goldin et al., 2006; Negre-Salvayre et al., 2009).

1.2.3. Metilglioxal

O MG é importante na formação de AGEs, havendo autores que o identificam como sendo o seu principal precursor *in vivo* (Goldin et al., 2006; Xue et al., 2011). O MG é um composto dicarbonilo que reage com biomoléculas (proteínas, lípidos, ADN, entre outras), é simultaneamente um aldeído e uma cetona, e encontra-se presente em todos os organismos (Desai et al., 2010; Rabbani & Thornalley., 2012). É citotóxico, dado que induz formação de ROS, apoptose e disfunção celular. O MG foi, em diversos estudos, implicado na activação de vias de *stress* celular, conduzindo a uma perda da viabilidade celular (Chan et al., 2007; Jia & Wu., 2007). A sua estrutura torna-o extremamente reactivo, ligando-se não enzimaticamente com os grupos amina (resíduos de lisina e arginina) das proteínas do meio envolvente, de que resulta a formação de AGEs (Xue et al., 2011; Rabbani & Thornalley., 2012). Como já foi referido, os AGEs estão implicados nas inúmeras complicações diabéticas, sendo que qualquer reacção que aumente os níveis de MG nos tecidos ou no plasma favorece estas complicações (Mathys et al., 2002; Brownlee., 2001). Em condições de hiperglicemia, os níveis citosólicos de aldeídos (metilglioxal, glioxal, entre outros) aumentam e através da indução de alterações na conformação de biomoléculas, nomeadamente proteínas, e de formação de ROS e AGEs, contribuem para o desenvolvimento das complicações diabéticas (Brownlee., 2005; Goldin et al., 2006; Negre-Salvayre et al., 2009).

1.3 Tecido adiposo – funções e mecanismos de desregulação

A prevalência da obesidade ganhou proporções epidémicas à escala global, com mais de um bilião de adultos com excesso de peso e mais de 300 milhões obesos. O excesso de peso, por si só, afecta negativamente a actividade física, a vitalidade e a qualidade de vida em geral. A obesidade visceral desempenha um papel central no desenvolvimento de doenças metabólicas, como a diabetes tipo 2, e constitui um risco acrescido de doenças cardiovasculares (Goossens., 2008; Christiaens & Lijnen., 2010; Kiess et al., 2008). Normalmente relaciona-se com disfunção metabólica, tais como intolerância à glicose, hiperinsulinemia, níveis elevados de ácidos gordos livres, diminuição de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e aumento de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Christiaens & Lijnen., 2010), estando este conjunto de alterações englobado na síndrome metabólica.

1.3.1. Funções do tecido adiposo

O tecido adiposo branco é uma estrutura complexa, heterogénea, constituída maioritariamente por adipócitos, mas também por diversas células do estroma, nomeadamente pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imunitário (Guilherme et al., 2008; Tang et al., 2008; Rutkowski et al., 2009; Christiaens & Lijnen., 2010).

O tecido adiposo divide-se em dois grandes tipos, branco e castanho, com funções diferentes no organismo. O tecido adiposo branco, visceral e subcutâneo, é constituído maioritariamente por adipócitos brancos, que lhe conferem a cor característica, constituindo o local de armazenamento de energia proveniente da dieta, sob a forma de triglicerídeos (Goossens., 2008; Gustafson., 2010; Maury & Brichard., 2010). Os triglicerídeos são constituídos por três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol. Por sua vez, o glicerol é sintetizado a partir da glicose disponível no interior do adipócito, constituindo assim uma importante forma de armazenamento deste açúcar redutor (Goossens., 2008; Guilherme et al., 2008). Os lípidos em circulação são transportados por lipoproteínas, que são reconhecidas por receptores presentes na membrana do adipócito (CD36). A lipoproteína lipase (LPL) efectua a hidrólise dos triglicerídeos das lipoproteínas, permitindo assim a entrada dos ácidos gordos livres através de uma proteína específica de transporte (FATP). Os ácidos gordos livres a nível intracelular são rapidamente inactivados por uma proteína adaptadora (aP-2), de forma a permitir nova esterificação em triglicerídeos (Ram., 2003; Wellen and Hotamisligil., 2003).

A insulina tem um papel fundamental, uma vez que estimula a captação de glicose pelo adipócito, induz a lipogénese e inibe a lipólise através da inibição da síntese de AMP cíclico (AMPC). A diminuição de AMPC limita a estimulação da cinase PKA, fosforilando e activando menos lipase hormono-sensitiva (HSL) uma enzima responsável pela hidrólise dos triglicéridos armazenados no interior da gota lipídica (figura 2). Por acção da insulina, estes são inseridos numa gota lipídica, rodeada por um aglomerado proteico (Perilipina A) que os protege da acção daquelas lipases. A fosforilação destas proteínas leva a uma exposição dos triglicéridos à acção de lipases (lipólise), o que acontece normalmente em estados de jejum e aquando do exercício físico. Nestas condições de défice energético e diminuição dos níveis de insulina, há síntese de uma maior quantidade de AMPC intracelular que origina, por conseguinte, uma maior activação da HSL, com a consequente libertação de ácidos gordos livres para a circulação, e a sua utilização posterior como fonte de energia (Goossens., 2008; Guilherme et al., 2008).

O tecido adiposo castanho, que quase desaparece no primeiro ano de vida, é mais enervado, tem mais mitocôndrias e vários vacúolos lipídicos. Os triglicéridos aqui armazenados são rapidamente hidrolisados e oxidados. São usados na cadeia transportadora de electrões que possui UCP-1 (proteína desacopladora, na cadeia transportadora de electrões) gerando calor, sendo a acção termogénica o principal papel do tecido adiposo castanho (Guilherme et al., 2008).

Nos últimos anos foi ultrapassada a ideia de que o tecido adiposo funcionava apenas como um local de armazenamento energético (Guilherme et al., 2008; Gustafson., 2010). De facto, no tecido adiposo branco há produção e secreção de diversas proteínas e factores autócrinos, parácrinos e endócrinos (Trayhurn & Wood., 2004; Galic et al., 2010).

O secretoma do tecido adiposo branco é constituído por adipocinas, quimiocinas e factores de crescimento, tais como: adiponectina, leptina, resistina, visfatina, PAI-1 (inibidor do activador do plasminogénio) TNF- α (factor de necrose tumoral α), TGF- β , interleucinas (IL-1, 6, 8, 10 e 18), factor de quimioatração de monócitos (MCP-1), factores angiogénicos e vasoactivos (factor de crescimento do endotélio vascular, angiopoietina-2 e angiotensina II), entre outros (Trayhurn & Wood., 2004; Hosogai et al., 2007; Ye et al., 2007; Goossens., 2008; Guilherme et al., 2008; Trayhurn et al., 2008b; Rutkowski et al., 2009; Galic et al., 2010; Maury & Brichard., 2010).

Através desta actividade secretora o tecido adiposo assume múltiplas funções metabólicas, imunológicas, endócrinas e, localmente, autócrinas e parácrinas (Tilg & Moschen., 2006; Guilherme et al., 2008; Galic et al., 2010).

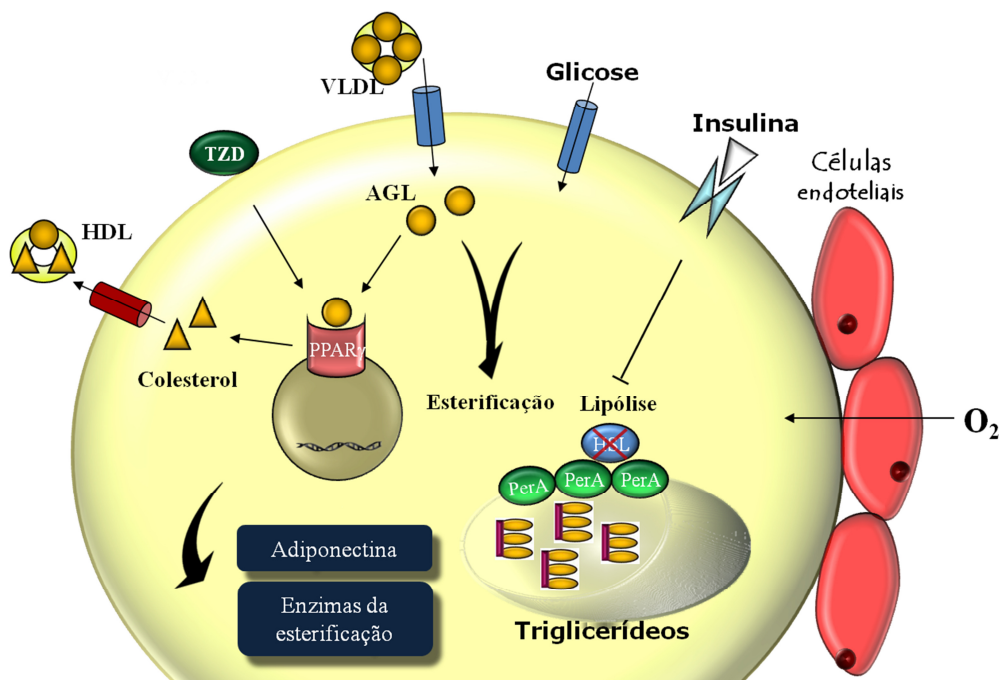


Figura 2 – Esquema integrativo dos diferentes mecanismos que compõem a fisiologia do tecido adiposo.

(AGLs), ácidos gordos livres; (O_2), oxigénio; (TZD), tiazolidinediona; (HSL), lipase hormono-sensível; (PerA), perilipina A; ($PPAR\gamma$), receptor activador da proliferação dos peroxissoma- γ ; (VLDL), lipoproteína de baixa densidade; (HDL), lipoproteína de alta densidade.

1.3.2. Disfunção do tecido adiposo

A desregulação do metabolismo lipídico e o aparecimento de processos regionais de hipoxia no tecido adiposo na obesidade têm vindo a ser apontados como os dois principais factores responsáveis pela activação de vias inflamatórias celulares. A activação destas vias tem implicações variadas, nomeadamente na insulino-resistência e na inibição do receptor activador da proliferação dos peroxissomas γ (PPAR γ), no secretoma, na angiogénese e no recrutamento de leucócitos, como sumariza a figura 3. Estas vias de disfunção são elucidadas nos pontos seguintes, com principal ênfase na via associada à hipoxia.

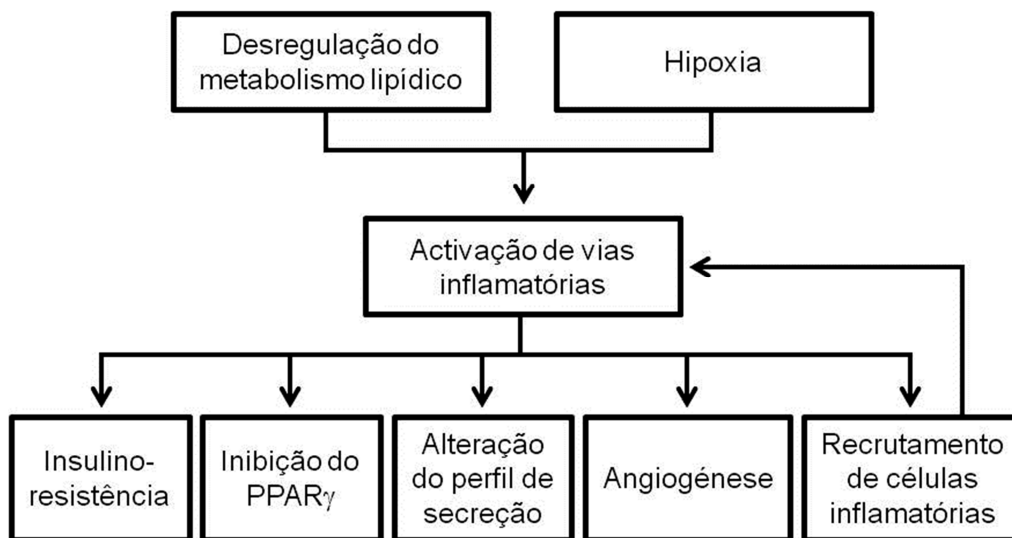


Figura 3 – Esquema integrativo dos dois principais factores de desregulação do tecido adiposo, e dos mecanismos fisiológicos de resposta decorrentes da activação de vias inflamatórias.

(PPAR- γ), receptor activador da proliferação dos peroxissoma- γ .

Desregulação lipídica

Uma alimentação altamente calórica leva a alterações no tecido adiposo, devido às dinâmicas de libertação e armazenamento de ácidos gordos livres (AGL). Nos estádios iniciais, os adipócitos conseguem dar resposta aos altos teores de lípidos ingeridos, armazenando-os na forma de triglicérides. O problema surge quando este mecanismo satura e há aumento da lipólise e maior libertação de AGL para a circulação (Rajala & Scherer., 2003; Guilherme et al., 2008). O aumento da disponibilidade de ácidos gordos provoca, em condições normais, um aumento da sua taxa de oxidação mitocondrial (Bugianesi et al., 2005). A limitação mitocondrial na oxidação de ácidos gordos, leva à sua acumulação e a um aumento dos seus derivados, nomeadamente acetil-CoA, ceramida e diacilglicerol, sendo descritos como activadores de vias de *stress* dependentes de cinases, tais como proteínas cinase C (PKC), cinase c-jun N-terminal (JNK) e a proteína cinase do I κ B (IKK β) (Qatanani & Lazar., 2007; Guilherme et al., 2008). Desenvolve-se uma resposta fisiológica com inibição da sinalização de insulina (fosforilação do substracto do receptor da insulina) e libertação do factor de transcrição NF- κ B, que, por sua vez, altera a transcrição génica de modo a que sejam segregados factores angiogénicos e sobretudo pró-inflamatórios (Moeschel et al., 2004; Qatanani & Lazar., 2007; Olefsky & Glass., 2010). Esta resposta induz inibição da lipogénese e favorece a ocorrência de lipólise, originando deposição ectópica de gordura e alterações nos tecidos afectados, com implicações patológicas, como referido anteriormente (Guilherme et al., 2008).

Hipoxia e angiogénese no tecido adiposo

A vascularização do tecido adiposo permite as trocas gasosas, o transporte de lípidos, de forma a serem armazenados/libertados pelos adipócitos, e o transporte dos seus produtos de secreção como as adipocinas (Guilherme et al., 2008; Rutkowski et al., 2009).

A angiogénese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes, é crucial na resposta à expansão do tecido adiposo. O balanço entre angiogénese e hipoxia tem um grande impacto na definição de “boa” e “má” expansão do tecido adiposo, como se mostra na figura 4. Quando a rede vascular não acompanha a expansão do tecido adiposo surgem focos de hipoxia no tecido, com a consequente activação de factores de transcrição como o NF- κ B e o factor induzido pela hipoxia 1- α (HIF-1 α) (Rutkowski et al., 2009).

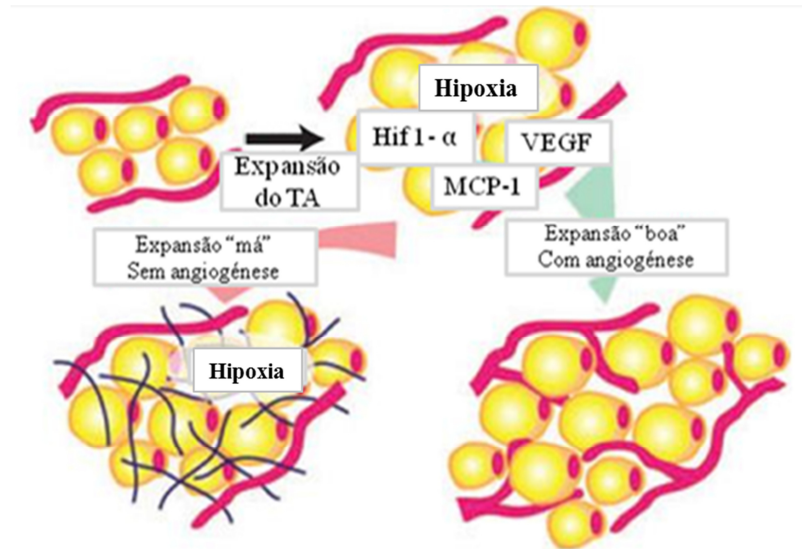


Figura 4 – Modelo representativo da expansão do tecido adiposo, com focos de hipoxia quando a angiogénese não acompanha de uma forma eficaz a hipertrofia dos adipócitos e a expansão do tecido.

(HIF-1 α), factor induzido pela hipoxia-1; (VEGF), factor de crescimento do endotélio vascular; (MCP-1), factor quimioatractivo de monócitos-1 (adaptado de Rutkowski *et al.* 2009).

Assim, a angiogénese é um processo fulcral e variável, sendo libertados diversos factores pelos adipócitos, células endoteliais e do estroma, com efeitos pró-angiogénicos e anti-angiogénicos. Os factores segregados são variadíssimos, tais como VEGF, angiopoietina 1 e 2 (Ang- 1 e Ang-2), TNF- α , leptina, PAI-1, factor de crescimento de fibroblastos β (FGF- β), factor de crescimento do tipo da insulina (IGF), integrina, vitronectina, fibrina, TGF- β , adiponectina, entre outros, que actuam na regulação da rede vascular (Lijnen., 2008; Rutkowski et al., 2009; Christiaens & Lijnen., 2010).

O VEGF tem uma função fundamental na regulação do endotélio e por conseguinte da vasculatura, estimulando a proliferação e a migração de células endoteliais. A acção do VEGF, juntamente com a acção das angiopoietinas 1 e 2, é fundamental ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, numa função concertada (Hausman & Richardson., 2004; Waltenberger., 2009).

No seguimento da activação de vias inflamatórias, decorrente dos fenómenos de hipoxia e desregulação do metabolismo lipídico, surgem estímulos angiogénicos no tecido adiposo na tentativa de restabelecer a homeostase (Rutkowski et al., 2009; Maury & Brichard., 2010).

O HIF-1 α é um regulador chave da tensão de oxigénio nas células, aumentando a expressão de diferentes genes que afectam várias funções biológicas, tais como angiogénese, glicólise, apoptose, proliferação celular e inflamação (Hosogai et al., 2007; Regazzetti et al., 2009). Na presença de oxigénio, o HIF-1 α sofre hidroxilação num resíduo prolina e é ubiquitinado e degradado via proteossoma. Na presença de hipoxia as prolina-hidroxilases são inibidas, ocorrendo uma estabilização e activação do factor de transcrição, com alteração da expressão génica, nomeadamente de factores angiogénicos como o VEGF (figura 5) (Wood et al., 2009; Giacco & Brownlee., 2010). Por sua vez, a activação do factor de transcrição NF- κ B em resposta à hipoxia, bem como ao aumento da concentração de TNF- α , induz aumento de HIF-1 α (Uden et al., 2008; Donath & Shoelson., 2011). A expressão génica é alterada e são expressos genes alvo, nomeadamente VEGF, como referido, e citocinas pró-inflamatórias, tais como MCP-1, interleucinas e TNF- α (Donath & Shoelson., 2011). Estes factores pró-inflamatórios, bem como a expressão das diferentes adipocinas são estímulos que se pensa estarem relacionados com os processos angiogénicos (Tilg & Moschen., 2006; Trayhurn et al., 2008a; Rutkowski et al., 2009; Giacco & Brownlee., 2010).

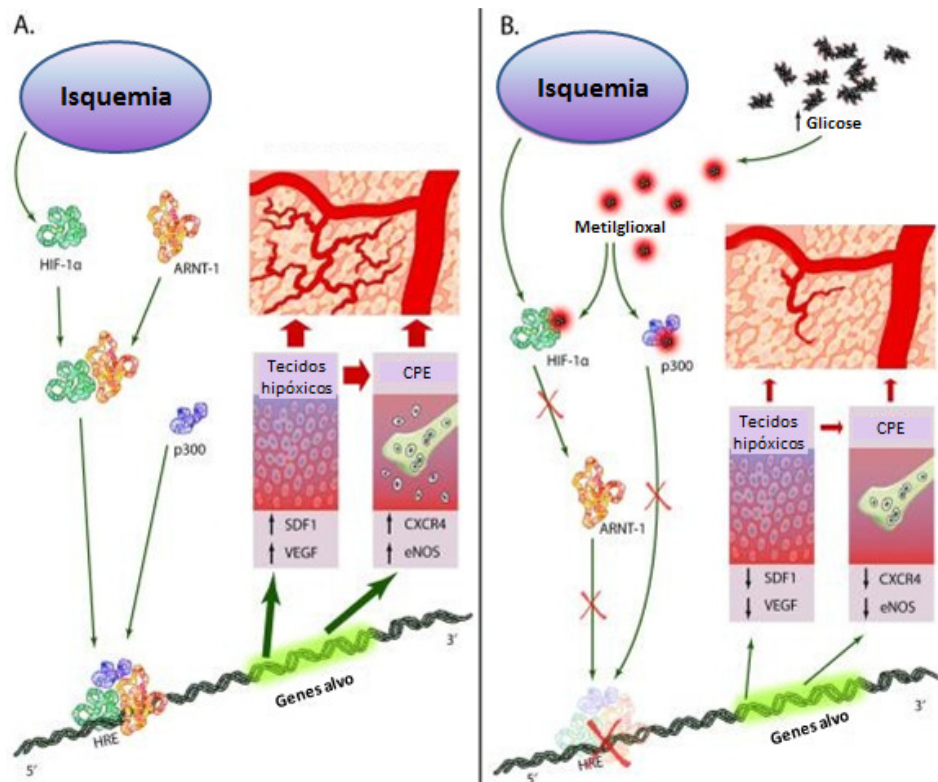


Figura 5 – Modelo de indução de angiogénese, na presença ou na ausência de elevadas concentrações de glicose.

(HIF-1 α), factor induzido pela hipoxia-1; (VEGF), factor de crescimento do endotélio vascular; (SDF-1), factor derivado do estroma-1; (CPE), células progenitoras do endotélio; (CXCR4), receptor do factor derivado do estroma; (eNOS), sintetase do óxido nítrico endotelial; (p300), coactivador do HIF-1 α ; (ARNT-1), hidrocarboneto translocador do receptor nuclear; (HRE), genes de resposta à hipoxia (adaptado de Giacco & Brownlee 2010).

Recrutamento, estimulação de leucócitos e inflamação

A activação de vias inflamatórias no tecido adiposo tem várias implicações, sendo que a insulino-resistência, predisposição para a ocorrência de lipólise, alteração do secretoma, acção pro-angiogénica e recrutamento de leucócitos (maioritariamente monócitos) são respostas comuns à hipoxia, que activa o factor de transcrição NF- κ B e assim vias inflamatórias no tecido adiposo (Tilg & Moschen., 2006; Qatanani & Lazar., 2007; Olefsky & Glass., 2010; Kimura et al., 2011).

A expansão do tecido, leva a uma acumulação de macrófagos no tecido adiposo branco, como anteriormente referido. Os pré-adipócitos têm também a capacidade de se diferenciar em macrófagos no sentido de captar o excesso de gordura e modular a resposta inflamatória às alterações do tecido adiposo (Tilg & Moschen., 2006; Goossens., 2008; Olefsky & Glass., 2010). O MCP-1 segregado por adipócitos, macrófagos e pela contínua quimioatração de monócitos, conduz ao aumento progressivo da infiltração de macrófagos e da inflamação local (Guilherme et al., 2008; Ye., 2010). O aumento local de macrófagos origina uma secreção aumentada de TNF- α e MCP-1, que perpetuam o processo inflamatório (figura 6). Os macrófagos removem adipócitos mortos, são mediadores pró-inflamatórios e segregam precursores angiogénicos, mas a sua actividade inflamatória pode ser nefasta ao nível celular (Olefsky & Glass., 2010; Ye., 2010).

O TNF- α é responsável por alterações da resposta celular, como diminuição da sensibilidade à insulina e inibição da formação de adipócitos (adipogénese) e alterações da expressão génica através da activação do NF- κ B, como referido anteriormente (Guilherme et al., 2008; Olefsky & Glass., 2010).

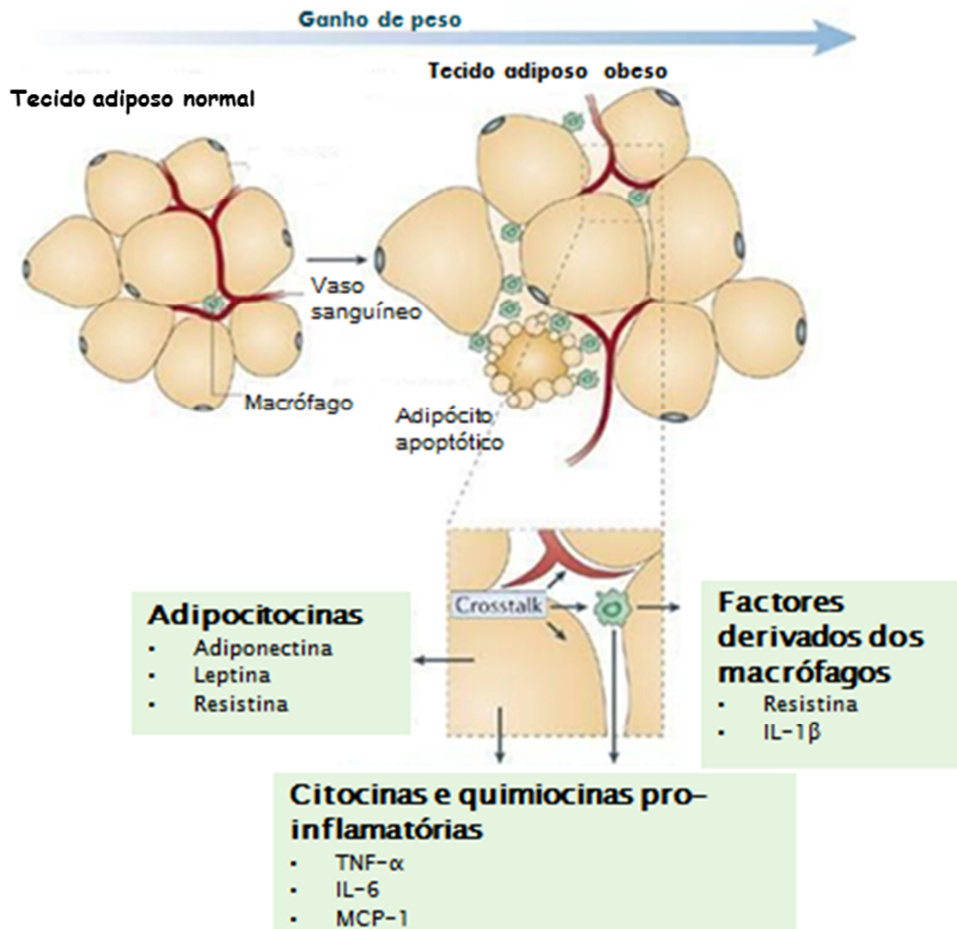


Figura 6 – Esquema representativo da hipertrofia do adipócito e o consequente aparecimento de focos de hipoxia e desregulação do tecido adiposo, com infiltração de macrófagos e alteração do seu secretoma.

(TNF- α), factor de necrose tumoral α ; (IL-1 β , IL-6), interleucina 1 β e interleucina 6; (MCP-1), factor quimioatrativo de monócitos-1 (Adaptado de Tilg & Moschen., 2006).

Insulino-resistência

No tecido adiposo, a activação de vias inflamatórias, nomeadamente o aumento de TNF- α , diminui a acção estimulante da insulina na captação de glicose e ácidos gordos, na estimulação da lipogénese e inibição da lipólise (Guilherme et al., 2008; Maury & Brichard., 2010). O subsequente fluxo de ácidos gordos conduz à deposição ectópica, nomeadamente no fígado e no músculo, com consequências estruturais e funcionais nestes tecidos. (Qatanani & Lazar., 2007; Guilherme et al., 2008). Outro aspecto importante decorrente do progressivo aumento de TNF- α , é a inibição da actividade do PPAR- γ , um importante regulador do metabolismo dos lípidos e dos hidratos de carbono (Nunn et al., 2007; Guilherme et al., 2008).

A activação de vias inflamatórias (NF- κ B), juntamente com a activação/fosforilação de resíduos de serina nas cinases das vias de *stress* (JNK e PKC), contribuem de uma forma significativa para o estabelecimento e progressivo aumento da insulino-resistência (Olefsky & Glass., 2010; Donath & Shoelson., 2011). A libertação de TNF- α pelos macrófagos e adipócitos, em adição à activação prévia das vias JNK e NF- κ B, tem uma acção directa no desenvolvimento de insulino-resistência (fosforilação dos substractos do receptor da insulina).

A hiperglicemia resultante da ineficiente sinalização da insulina tem diversas implicações sistémicas. Ocorre um aumento do *stress* oxidativo e de intermediários glicolíticos, contribuindo assim para a activação de vias celulares responsáveis pelo desenvolvimento das complicações diabéticas como já foi referido (Brownlee., 2001; Brownlee., 2005; Strissel et al., 2007).

1.4 Questões a esclarecer

A literatura descreve a redução da rede vascular como sendo o factor preponderante para o aparecimento de regiões hipóxicas no tecido adiposo, durante a sua expansão. A hipoxia activa a expressão de factores pró-angiogénicos responsáveis pela expansão da vasculatura e a inflamação local, através dos factores de transcrição HIF-1 α e NF- κ B (Neels et al., 2004; Rutkowski et al., 2009).

A correcta adaptação da vasculatura aos estímulos é fundamental na prevenção do desenvolvimento de regiões hipóxicas e de perda das funções do tecido adiposo. A falência desta resposta compensatória pode originar disfunção microvascular e desregulação do tecido adiposo (Hosogai et al., 2007; Rutkowski et al., 2009). A disfunção microvascular pode estar, assim, na origem do desenvolvimento de regiões hipóxicas no tecido adiposo, com a consequente activação de vias inflamatórias, como anteriormente abordado (Tilg & Moschen., 2006; Rutkowski et al., 2009).

O nosso grupo demonstrou, nos ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo de diabetes tipo 2 não obesa, que a hiperglicemia induz fibrose e acumulação de material PAS positivo e menor irrigação do tecido adiposo, alterações agravadas com o envelhecimento (Matafome et al., 2012a). Também a administração de MG em ratos *Wistar* normais levou ao decréscimo do rácio VEGF/Ang-2, sendo este correlacionado com a diminuição da irrigação e hipoxia no tecido adiposo (Matafome et al., 2012a). A microvasculatura do tecido adiposo tem um papel preponderante na resposta aos focos de hipoxia, nomeadamente quando o tecido se apresenta hipertrófico, como demonstra o esquema integrativo (figura 7). Poderá o metilglicoxal (ou a glicação), induzir alterações na microcirculação que dificultem a adaptação do tecido adiposo a condições de hipoxia?

A disfunção microvascular potenciada pela via dos AGEs, nomeadamente pela importante acção do metilglioxal, afecta também de uma forma significativa a resposta angiogénica e inflamatória do tecido à isquemia (figura 5) (Giacco & Brownlee 2010). Qual será o envolvimento de factores angiogénicos e inflamatórios, nomeadamente VEGF, SDF1, MCP-1, Ang-2, entre outros, no tecido, bem como de eNOS e CXCR4 a nível do endotélio vascular?

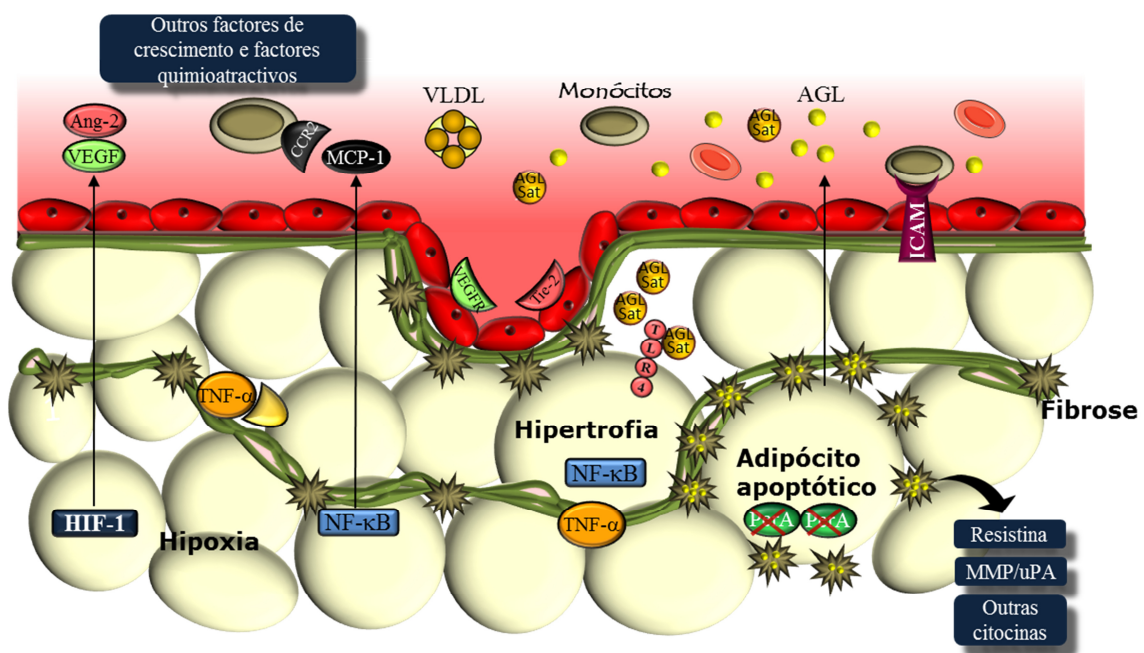


Figura 7 – Esquema integrativo do *feedback* existente entre a microvasculatura e o tecido adiposo hipertrófico, com os vários factores de crescimento e quimioatractivo representados.

(TNF- α), factor de necrose tumoral α ; (Ang-2), angiopoietina 2; (Tie-2), receptor membranar activado por angiopoietinas; (MCP-1), factor quimioatractivo de monócitos-1; (HIF-1 α), factor induzido pela hipoxia-1; (VEGF), factor de crescimento do endotélio vascular; (VEGFR), receptor do factor de crescimento do endotélio vascular; (CCR2), receptor de citocinas; (AGLs), ácidos gordos livres; (AGL-Sat), ácidos gordos livres saturados; (PerA), perilipina A; (VLDL), lipoproteína de muito baixa densidade; (NF- κ B), factor de transcrição nuclear *kappa* B; (MMP), metaloproteínas; (uPA), activador do plasminogénio tipo urocinase; (TLR4), receptor do tipo *toll like* 4; (ICAM), molécula de adesão intracelular.

CAPÍTULO 2

OBJECTIVOS

CAPÍTULO 2. OBJECTIVOS

Em indivíduos obesos ocorre uma redução da irrigação do tecido adiposo em aproximadamente 35%. Assim, o primeiro objectivo deste trabalho foi a criação de um novo modelo de redução parcial da irrigação no tecido adiposo epididimal esquerdo, através da laqueação de vasos sanguíneos específicos. Este procedimento, a realizar em ratos *Wistar* normais, permitiria excluir outras variáveis, comumente encontradas nos modelos de obesidade.

Tendo por base o modelo criado, o principal objectivo deste trabalho foi a avaliação do papel do metilglioxal, um dos maiores precursores de AGEs *in vivo*, nos mecanismos de adaptação metabólica do tecido adiposo epididimal à redução parcial da irrigação durante, 1 e 48 horas, e a consequente repercussão sistémica das alterações do tecido.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes utilizados

No caso de não ser referido, todos os reagents foram comprados à Merck Darmstad (Alemanha), Sigma-Aldrich (EUA) e Pancreac Química SA (Espanha). Foram usados os anticorpos para detectar actina- α e tubulina- α (Sigma-Aldrich, USA), ERK1/2, p-ERK1/2, I κ B α , PPAR γ , AKT, p-AKT (Cell Signaling, EUA), VEGF (Calbiochem/Merk, Germany), Perilipina A e CD 31 (Abcam, RU) e CEL (TransGenic Inc, Japão).

3.2. Modelos animais

Neste trabalho foram estudados ratos normais da estirpe *Wistar* com seis meses de idade, provenientes da nossa colónia na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os animais foram mantidos em condições padrão de ventilação, temperatura (22-24°C), humidade (50-60%) e luz (12h luz/escuro) com acesso livre a água e ração (dieta padrão AO3, Panlab, Barcelona). Os protocolos experimentais com os modelos animais foram previamente aprovados pelo Comité de Ética local, tendo sido igualmente seguidas as recomendações internacionais de utilização e manutenção de animais de laboratório. Em adição, todos os procedimentos foram efectuados por pessoas devidamente habilitadas (Curso válido para a Federação Europeia das Associações Científicas e de experimentação Animal – FELASA, com certificação da Direcção Geral de Veterinária).

Protocolo de indução de glicação por metilglioxal: Procedeu-se à implementação de um modelo de estudo de glicação induzida pela administração de um agente indutor de glicação, o metilglioxal. Assim, um grupo de ratos normais *Wistar* (WM: n=12) foi tratado diariamente com metilglioxal (Sigma, EUA) durante 8 semanas (75 mg/Kg/dia), diluído na água do biberão, com um controlo diário e com pesagem semanal para efectuar os devidos ajustes à dosagem. Um outro grupo de ratos normais *Wistar* (W: n=12) foi mantido sem qualquer tratamento, para servirem de controlo ao modelo de glicação induzida (WM).

Protocolo cirúrgico para bloqueio de vasos sanguíneos: Após as 8 semanas de tratamento, 4 ratos de cada grupo (W; WM) foram usados como controlos, enquanto 8 foram sujeitos a um procedimento cirúrgico de redução da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo, durante 1 e 48 horas. O procedimento cirúrgico iniciou-se após indução do estado de anestesia (cloreto de ketamina 75 mg/kg, i.m., Parke-Davis, Ann Arbor, USA e cloreto de clorpromazina 2.65 mg/kg, im, Lab. Vitória, Portugal). Procedeu-se, então, a uma incisão sagital da parede abdominal e do peritoneu, com exposição da artéria genital esquerda e da veia proveniente do tecido adiposo epididimal esquerdo a que se seguiu a sua laqueação com fio de sutura (Cònsol et al., 2005). O peritoneu (fio de 0,7 mm, Braun, Alemanha) foi seguidamente suturado bem como a parede abdominal (fio de 2 mm, Braun, Alemanha), de forma a permitir a recuperação dos animais e a sua manutenção durante as subsequentes 1 ou 48 horas. Assim, a redução do fornecimento sanguíneo ao tecido adiposo epididimal esquerdo foi mantida durante 1 hora (Wi1h e WMi1h, n=4/grupo) (figura 8) ou 48 horas (Wi48h e WMi48h, n=4/ grupo) (figura 9), sendo que o tecido adiposo epididimal direito foi usado como

controlo interno (Wc 1h e WMc 1h; Wc 48h e WMc 48h, n=4/grupo) (figuras 8 e 9), respectivamente.

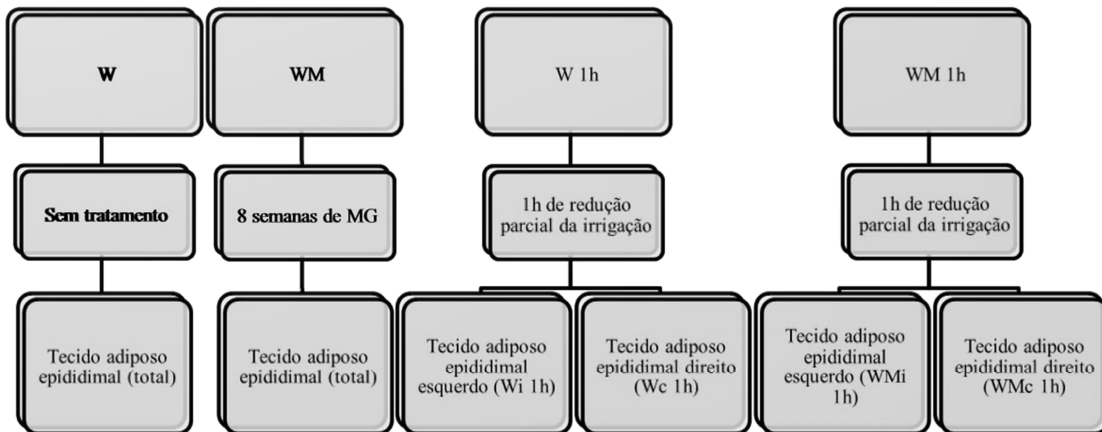


Figura 8 – Diagrama representativo dos grupos de estudo e as respectivas condições, com laqueação de vasos durante 1 hora.

W – Ratos *Wistar* normais; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora; Wc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora no tecido adiposo epididimal esquerdo; WMi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas; WMc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora do tecido adiposo epididimal esquerdo e administração de MG durante 8 semanas. MG, metilglioxal; total, representa o tecido adiposo epididimal esquerdo e direito.

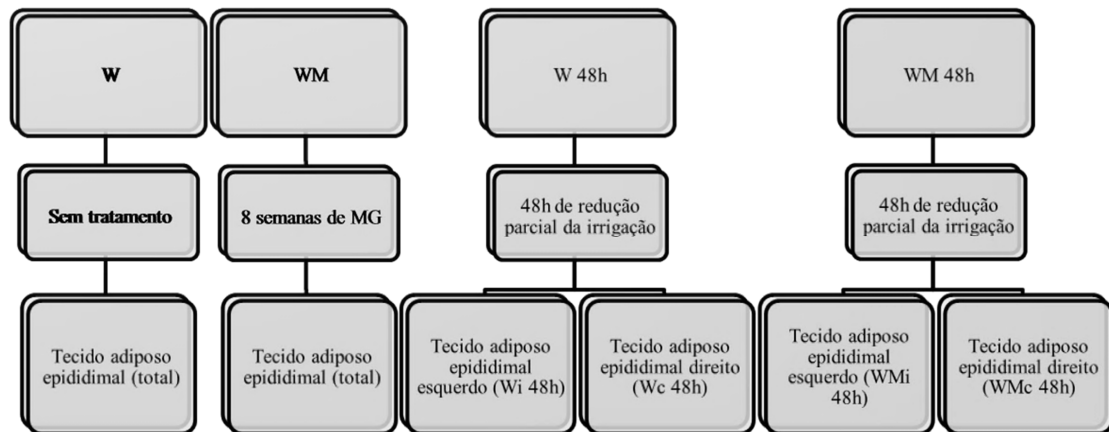


Figura 9 – Diagrama representativo dos grupos de estudo e as respectivas condições, com laqueação de vasos durante 48 horas.

W – Ratos *Wistar* normais; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 48 horas; Wc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 48 horas no tecido adiposo epididimal esquerdo; WMi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas; WMc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 48 horas do tecido adiposo epididimal esquerdo e administração de MG durante 8 semanas. MG, metilglioxal; total, representa o tecido adiposo epididimal esquerdo e direito.

3.3. Análises *in vivo*

Teste de tolerância à glicose: Depois da administração de MG e antes do procedimento cirúrgico, todos os ratos foram testados para aferir a sua tolerância à glicose. Assim, duas horas após a administração intraperitoneal de glicose (1,8g/Kg peso), foi medida a glicemia (sangue total, veia da cauda) pelo método da glicose oxidase, com um glicómetro. O peso corporal dos animais foi registado antes da administração da glicose.

Colheitas de sangue e tecido adiposo epididimal: Após a medição, em jejum, da glicemia, hemoglobina glicada (HbA_{1c}), triglicerídeos e colesterol total pelos métodos abaixo discriminados, foi feita a colheita de sangue, por punção cardíaca, com os animais anestesiados de acordo com o referido na secção 3.2. O sangue colhido foi dividido em tubos BD Vacutainer (para soro) e BD Vacutainer K3E (para plasma) (RU). Os sangues foram centrifugados a 3500xg, 4°C, durante 15 minutos e o soro e o plasma aliquoteados e guardados a -80°C. Seguidamente, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os seus tecidos adiposos epididimais colhidos, divididos e armazenados em 4 fragmentos: 10% formalina, congelados a -80°C, em blocos de parafina e *OCT*.

Parâmetros sistémicos: Previamente ao sacrifício dos animais, nos ratos com laqueação dos vasos sanguíneos durante 48 horas e nos controlos, a glicose em jejum (6 horas) e a HbA_{1c} foram medidos, usando um glicómetro (Elite – Bayer SA, Portugal) e um medidor portátil (DCA2000+ system Siemens, Portugal), respectivamente.

Os níveis de insulina (jejum de 6 horas) foram determinados no soro, usando um Kit de ELISA para rato (Mercodia, Sweden). Os níveis séricos de adiponectina foram igualmente determinados por técnicas imunoenzimáticas (ELISA) (Rat Adiponectin Immunoassay – Invitrogen, EUA). Os níveis plasmáticos de ácidos gordos livres (AGL) foram quantificados espectrofotometricamente recorrendo a um ensaio enzimático colorimétrico (Half-micro Test - Roche Diagnostic, Germany). Os níveis de colesterol total e triglicerídeos no soro, foram determinados através de kits comerciais (Olympus-Diagnóstica, Portugal, Produtos de Diagnóstico SA, Portugal).

3.4. Determinação dos níveis de proteínas no tecido adiposo epididimal - *Western Blotting*

Preparação das amostras: Foram realizados homogeneizados de tecido adiposo epididimal (300 mg) em tampão de lise (tabela 1). O tampão de lise foi previamente arrefecido em gelo à semelhança das amostras, para assim precaver a sua degradação. Procedeu-se à centrifugação dos homogeneizados a 14000xg, durante 20 minutos a 4°C e à recolha dos sobrenadantes. Dependendo da quantidade de lípidos resultante da primeira centrifugação, procedeu-se (ou não) a uma segunda centrifugação. No final, os sobrenadantes foram aliquoteados e mantidos a -80°C. Seguidamente efectuou-se a quantificação de proteína pelo método de BCA, em triplicado para cada amostra. O Tampão de *loading* (4x) (tabela 1) foi adicionado aos extractos tendo em conta o seu volume, de forma a efectuar-se um carregamento por poço de 50mg de proteína. Previamente à realização da electroforese, as amostras foram sonicadas durante 5 segundos e aquecidas a aproximadamente 100°C durante 5 minutos.

Electroforese vertical (SDS-PAGE): Os géis *resolving* e *stacking* foram efectuados segundo as soluções tamponadas apresentadas (tabela 1). Foram, assim, efectuados géis de poli-acrilamida de 6% a 15%, 1mm de espessura e com 15 poços, sendo o sistema de electroforese preenchido com tampão de corrida (tabela 1). A separação das proteínas ocorreu pelo seu peso molecular, sendo que o marcador utilizado, *Precision Plus Protein Standard* (Biorad, EUA), permite conhecer a separação das proteínas pelo seu peso molecular no gel.

Transferência para membrana de PVDF: Após electroforese vertical com separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular, procedeu-se à transferência das proteínas do gel para uma membrana de *polyvinylidene fluoride* (PVDF), utilizando um tampão de transferência apropriado (tabela 1). Após a transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF, as membranas foram bloqueadas com solução TBST (tabela 1), suplementada com 5% de albumina de soro bovino (BSA), para assim aumentar a especificidade de ligação dos anticorpos nos passos subsequentes.

Marcação com anticorpos específicos: Após a fase de bloqueio as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (α -actin, α -tubulin, AKT, p-AKT, ERK 1/2, p-ERK 1/2, SAP/JNK1, p-SAP/JNK1, I κ B α , PPAR γ , Perilipin A, VEGF e CEL), durante a noite, a 4°C. Após o período de incubação as membranas foram lavadas com solução TBST durante 1 hora para remover o anticorpo ligado de forma inespecífica. De seguida, procedeu-se à incubação com os respectivos anticorpos secundários (anti-coelho e anti-cabra, Bio-Rad, EUA; anti-ratinho, GE Healthcare, RU), durante duas horas, à temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas com solução de TBST, durante duas horas.

Revelação das membranas: As membranas incubadas com o anticorpo secundário anti-ratinho foram incubadas com o reagente ECF, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, e reveladas posteriormente num sistema de detecção de fluorescência Typhoon (GE Healthcare Life Sciences, EUA). No caso dos anticorpos secundários serem anti-coelho e anti-cabra, as membranas foram incubadas com o reagente ECL durante 5 minutos, à temperatura ambiente, sendo posteriormente lidas num sistema de detecção de luminescência Versadoc (Bio-Rad, EUA). As membranas foram posteriormente analisadas, ou seja, foram quantificadas as bandas, usando para tal o *software* Image Quant® (Molecular Dynamics, EUA).

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

Solução PBS: 135mM NaCl, 65 mM Na₂HPO₄, 25mM KCl e 0,1%

Tween20, pH= 7

Solução TBS: 250mM Tris, 1,5mM NaCl, pH=7,6

Solução TBST: Solução TBS + 1% Tween20

Tampão de corrida: 125mM Tris-base, 480mM glicina, 1% SDS, pH=8,8

Tampão de lise: 0,25M Tris-HCl; 150mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.5%

SDS; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 20mM NaF; 2mM Na₃VO₄; 10mM β-

glicerofosfato; 2.5mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 40 µl de

cocktail inibidor de proteases/g de tecido (Sigma, EUA), pH = 7,7

Tampão de transferência: 50mM CAPS, 2% NaOH, 10% metanol, pH=11

Tampão *loading*: 62,5 mM Tris, 1% SDS, 1,25 ml glicerol e 0,01% (w/v)

bromophenol blue, pH=6,8

Tampão *resolving*: 0,75M Tris-HCl, 0,2% SDS, pH=8,8

Tampão *stacking*: 0,25M Tris-HCl, 0,2% SDS, pH=6,8

(HCl), ácido clorídrico; (Tris), tris(hidroximetil)aminometano; (SDS), Dodecil sulfato de sódio; (NaCl), Cloreto de sódio; (NaOH), hidróxido de sódio; (EDTA), ácido etilenodiamino tetra-acético; (EGTA), ácido tetra-acético etileno de glicol; (NaF), Fluoreto de sódio; (Na₃VO₄), Ortovanadato de sódio; (PMSF, fluoreto de Fenilmetilsulfonilflúor; (TBS), Solução de Tris tamponada; (PBS), tampão fosfato-salino; (Na₂HPO₄), hidrogenofosfato dissódico; (KCl), cloreto de potássio).

3.5. Histologia do tecido adiposo epididimal

Foram aplicadas a cortes histológicos (4 µm) de tecido adiposo epididimal (dois cortes/animal em três animais/grupo), preservados previamente em blocos de parafina,

as técnicas de coloração, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Tricrómio de Masson (TM). A primeira identifica hidratos de carbono/glicoconjugados e a segunda marca tecido conjuntivo/acumulação de colagénio.

3.6. Imunohistoquímica de tecido adiposo epididimal

Imunohistoquímica convencional: Foram efectuadas (micrótomo) duas secções (4 µm) de tecido parafinado por animal e estudados 3 animais por cada grupo. Após a desparafinação com xilol, as lâminas foram submetidas a várias passagens em concentrações decrescentes de etanol (100%, 70% e 30%), culminando com a passagem por água visando a hidratação das secções. Seguiu-se a recuperação de antigénios, incubando as secções em tampão citrato (10mM, 0,05% Tween20) durante 30 minutos a 98°C. Seguiram-se várias lavagens com solução PBS (tabela 1) e bloqueio durante uma hora, à temperatura ambiente (PBS com 10% soro de cabra). Durante os vários passos, foi seguido o protocolo recomendado pelo fabricante (DAB150 immunoperoxidase secondary detection system JH1743622, Millipore, EUA). As secções de tecido foram incubadas durante a noite, a 4°C, com o anticorpo primário (Perilipina A, diluído 1:100 em PBS).

Um período de lavagem decorreu antes da incubação de 2 horas, à temperatura ambiente, para o anticorpo secundário proveniente de um kit comercial para detecção de proteínas por imunohistoquímica (IHC peroxidase kit, Chemicon, EUA). Depois de lavadas, as secções foram incubadas com a enzima (Horseradish Peroxidase, HRP), durante 30 minutos, à temperatura ambiente. As secções foram lavadas novamente e incubadas com diaminobenzidina (DAB), o substrato da enzima HRP, e coradas

posteriormente com hematoxilina. Após nova lavagem, procedeu-se à sua desidratação, com concentrações crescentes de etanol e, no final, xilol. Por fim, as secções foram montadas com meio de montagem previamente aquecido, no estado líquido (DAKO, EUA) e posteriormente analisadas (microscópio com leitura no campo do visível, com máquina fotográfica incorporada, Motic AE31, Motic Company, China).

Imunohistoquímica de fluorescência específica para o corante Evans Blue: Recorrendo a um corante azul que possui alta afinidade para a albumina sérica (*Evans Blue*), é possível a visualização macroscópica da rede vascular, através da quantificação da sua fluorescência, por imunohistoquímica. Um conjunto diferente de ratos normais *Wistar* (n=3/grupo) foi injectado i.v. (veia jugular) com *Evans Blue* (100mg/kg, diluído em PBS) após o procedimento cirúrgico de laqueação dos vasos sanguíneos durante 1 e 48 horas (Isq 1h e Isq 48h). Os tecidos foram recolhidos 5 minutos após a administração de *Evans Blue* e quantificada a percentagem de irrigação em comparação ao nosso controlo interno (controlo positivo) e também a um tecido branco sem a presença do corante (basal). Para tal, foi utilizado um microscópio de fluorescência (Leica DMIRE2, Leica Microsystems, Alemanha) com filtro Texas red ($\lambda=555/38$). Foram efectuadas 10 imagens de cada amostra, aleatoriamente, sendo excluídas as imagens que continham artérias de maior calibre, de forma a evitar zonas com fluorescência exacerbada e minimizar, assim, as diferenças entre os locais de análise. A fluorescência total dos campos foi quantificada utilizando o *software* ImageJ (NIH, EUA).

3.7. Análise estatística

Os resultados são apresentados com média \pm epm. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para determinar diferenças estatísticas entre os grupos, sendo consideradas diferenças significativas se $p < 0,05$.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

CAPÍTULO 4. Resultados**4.1. Quantificação da redução do fornecimento sanguíneo ao tecido adiposo epididimal esquerdo**

Um grupo controlo sem o corante *Evans Blue* foi usado para quantificar a fluorescência basal do tecido adiposo (figura 10, figura representativa do controlo negativo). Nos ratos isquémicos, o tecido adiposo epididimal direito sem laqueação de vasos sanguíneos foi considerado o nosso controlo positivo calculado como 100% de irrigação do tecido (figura 10, controlo positivo). A laqueação de vasos sanguíneos no tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 e 48 horas resultou numa diminuição do fornecimento sanguíneo para aproximadamente 60% (figura 10, Isq 1h e Isq 48h). Assim, a laqueação dos vasos sanguíneos resultou numa redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo, em comparação ao tecido adiposo epididimal direito, o nosso controlo interno ($p < 0,001$).

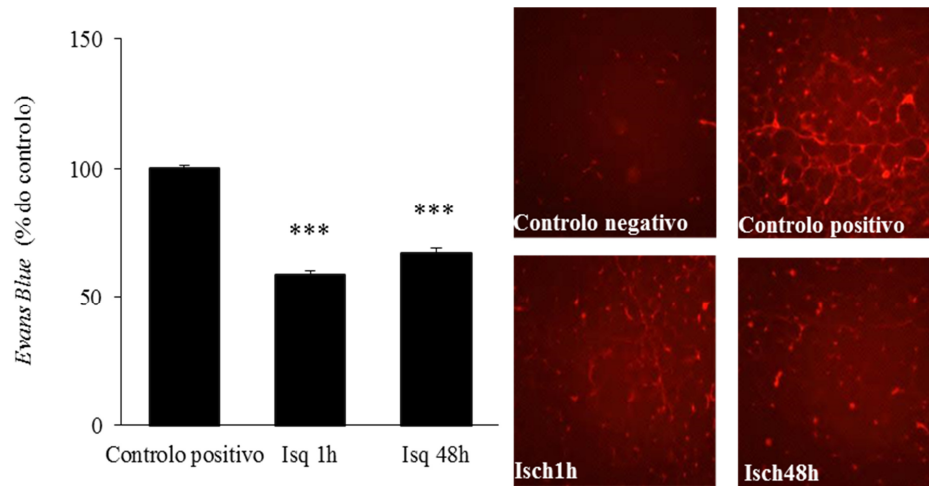


Figura 10: Quantificação do corante *Evans Blue* no tecido adiposo epididimal e respectivas figuras representativas.

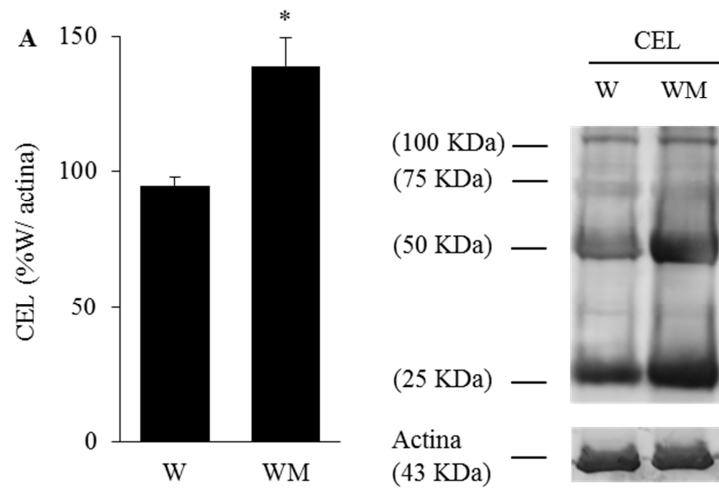
Contolo negativo – Tecido adiposo epididimal sem presença do corante *Evans Blue*; Controlo positivo – Tecido adiposo epididimal direito, sem qualquer laqueação; Isq 1h – Tecido adiposo epididimal esquerdo com laqueação de vasos sanguíneos específicos durante 1 hora; Isq 48h – Tecido adiposo epididimal esquerdo com laqueação de vasos sanguíneos específicos durante 48 horas.

Dados apresentados como média \pm epm, n=3/grupo; ampliação de 100X.

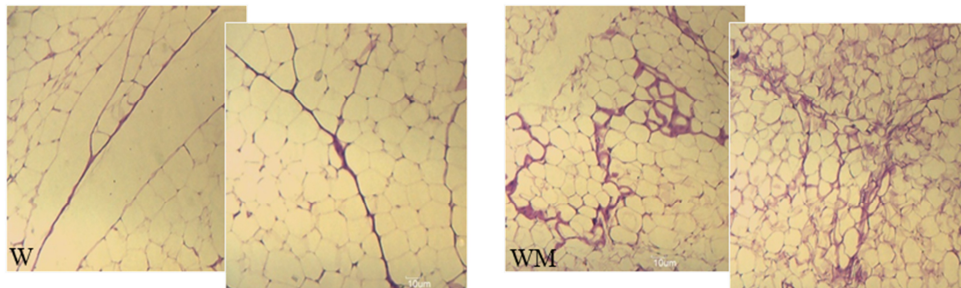
* Diferente do controlo positivo. 3 símbolos $p < 0,001$.

4.2. Avaliação da indução de glicação no tecido adiposo epididimal pela administração de metilglioxal

A administração de MG durante 8 semanas resultou num aumento dos níveis de carboxietil-lisina (CEL) no tecido adiposo epididimal ($p < 0,05$), sendo este um AGE produzido directamente a partir do MG (figura 11A). A marcação histológica de componentes glicosados (figura 11B) e fibróticos (figura 11C) no tecido adiposo epididimal do grupo sujeito à administração de MG (WM) revelou um fenótipo aumentado em comparação ao grupo controlo (W).



B. Ácido Periódico de Schiff (PAS) (200X)



C. Tricrômio de Masson (TM) (200X)

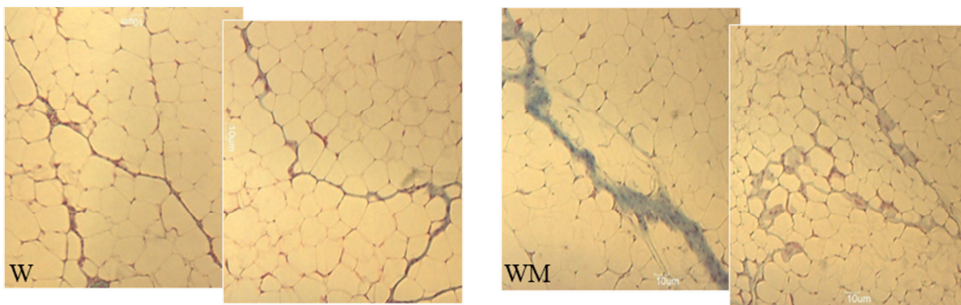


Figura 11: Quantificação por *Western Blotting* do marcador de glicação CEL no tecido adiposo epididimal e respectivas figuras representativas (A). Marcação histológica de materiais glico-conjugados (PAS) (B) e de componentes fibróticos (TM) no tecido adiposo epididimal (C).

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas. Dados apresentados como média \pm epm, n=4/grupo;

* Diferente do grupo W. 1 símbolo $p < 0,05$. PAS 200X; TM 200X.

4.3. Efeitos da administração de MG durante 8 semanas no peso corporal, na tolerância à glicose, hemoglobina glicada e no colesterol total

A administração de MG não alterou de forma significativa o peso corporal, a glicemia duas horas após administração de glicose, a hemoglobina glicada e os níveis de colesterol total (tabela 2).

Tabela 2: Peso corporal, glicemia 2 horas após administração i.p. de glicose (1,8 g/kg), hemoglobina glicada e níveis séricos de colesterol total.

Parâmetro	W	WM
Peso corporal (g)	430±17	440±18
Glicemia às 2h (mg/dL)	92±6.1	91.3±1.8
HbA1c (%)	3.6±0.1	3.6±0.0
Colesterol total (mg/dL)	92.5±5.8	84.7±4.7

W – ratos *Wistar*; WM – ratos *Wistar* com administração de metilglioxal durante 8 semanas.

Valores apresentados como média ± epm, n=12 em cada grupo.

4.4. Marcadores sistêmicos 48 horas após uma redução parcial da irrigação

A administração de MG não induziu alterações significativas na glicemia, e na insulinemia, em comparação com o grupo controlo (figura 12). Por outro lado, a redução parcial do fornecimento sanguíneo ao tecido adiposo epididimal esquerdo, durante 48 horas, causou um aumento significativo da glicemia e da insulinemia nos ratos *Wistar* (W 48h; $p < 0,05$) e no grupo com administração prévia de MG (WM 48h; $p < 0,01$), em relação aos respectivos controlos (Figura 12).

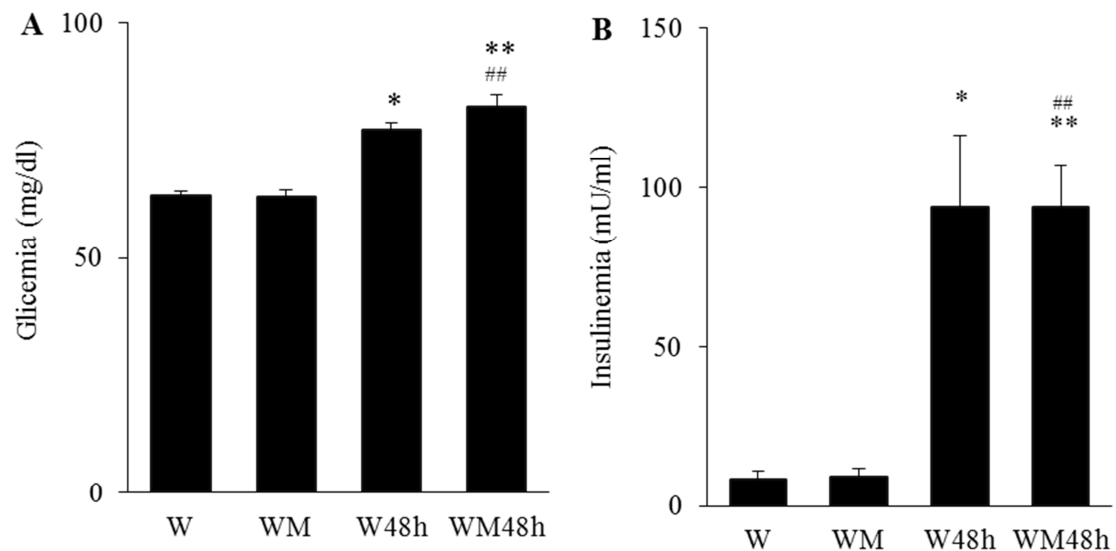


Figura 12: Níveis sistêmicos de glicose e insulina.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; W 48h - Ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WM 48h - Ratos *Wistar* com administração de metilglioxal durante 8 semanas e redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas.

Dados apresentados como média \pm epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM. 1 símbolo $p < 0,05$; 2 símbolos $p < 0,01$.

A administração de MG (grupo WM) resultou num aumento estatisticamente significativo dos níveis sanguíneos de ácidos gordos livres ($p < 0,05$), mas não de triglicerídeos, em comparação ao grupo controlo (W) (Figura 13). O aumento dos ácidos gordos livres após administração de MG não foi alterado pelo procedimento cirúrgico (figura 13A). No entanto, um aumento significativo dos níveis de triglicerídeos ($p < 0,05$) foi observado no grupo W 48h, quando comparado com o controlo WM (Figura 13B).

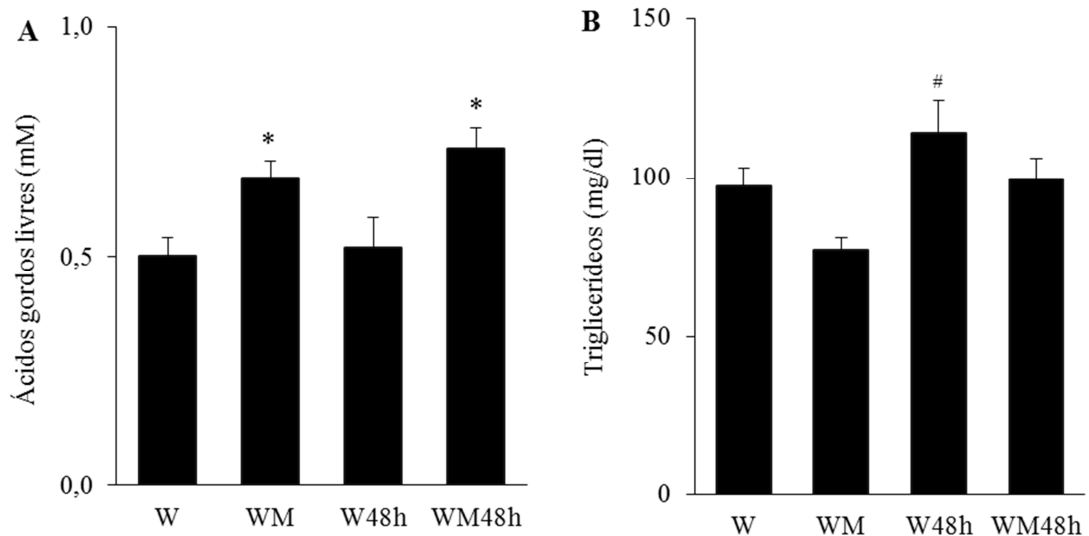


Figura 13: Quantificação espectrofotométrica dos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres e dos níveis sistêmicos de triglicérides.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; W 48h - Ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WM 48h - Ratos *Wistar* com administração de metilglioxal durante 8 semanas e redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas.

Dados apresentados como média \pm epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM. 1 símbolo $p < 0,05$.

Foi observada uma redução não significativa da adiponectinemia após a redução parcial do fornecimento sanguíneo nos ratos *Wistar* (W 48h) e após a administração de MG e submetido a redução parcial da irrigação (WM 48h), em comparação ao grupo W (Figura 14).

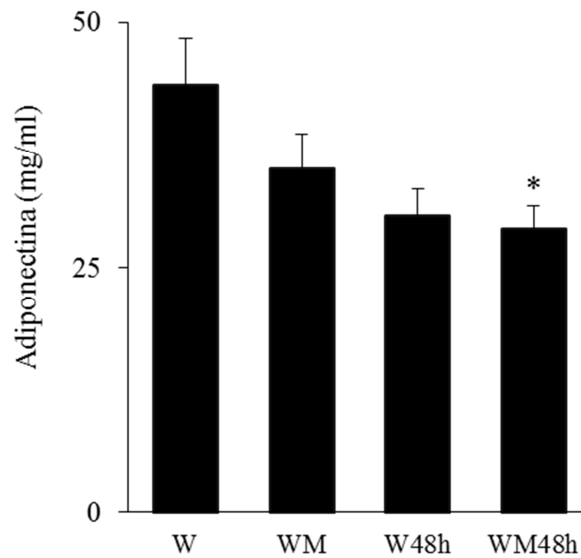


Figura 14: Níveis séricos de adiponectina.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; W 48h - Ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WM 48h - Ratos *Wistar* com administração de metilglioxal durante 8 semanas e redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas.

Dados apresentados como média \pm epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W. 1 símbolo $p < 0,05$.

4.5. Sinalização do tecido adiposo epididimal após uma redução parcial da irrigação durante 1 hora

A redução parcial da irrigação durante 1 hora originou um aumento da fosforilação da cinase ERK1/2 (p-ERK1/2) no tecido adiposo epididimal esquerdo dos ratos sujeitos à administração de MG, quando comparados ao grupo W ($p < 0,01$), WM ($p < 0,05$) e Wi 1h ($p < 0,05$) (Figura 15).

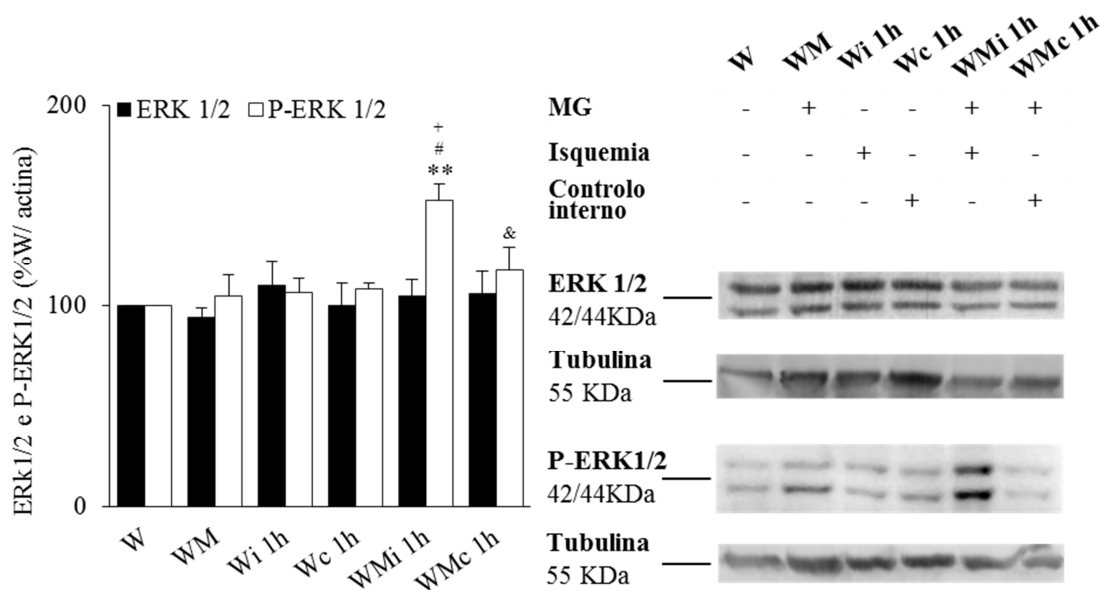


Figura 15: Expressão de ERK1/2 e P-ERK1/2 no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora; Wc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora; WMi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas; WMc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média ± epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM; + Diferente do grupo Wi 1h; & Diferente do grupo WMi 1h. 1 símbolo p<0,05; 2 símbolos p<0,01.

A activação da ERK1/2 foi concomitante com o aumento da degradação do inibidor do NF-κB (IκBα) no grupo WMi 1h, em comparação os grupos W e WM (p<0,001) (Figura 16). Também o controlo interno dos ratos tratados com MG demonstraram um decréscimo significativo dos níveis de IκBα, quando comparados ao grupo WM

($p < 0,05$). Foi também observado um decréscimo significativo dos níveis de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ no grupo Wi 1h, quando comparado ao controlo W ($p < 0,05$) (Figura 16).

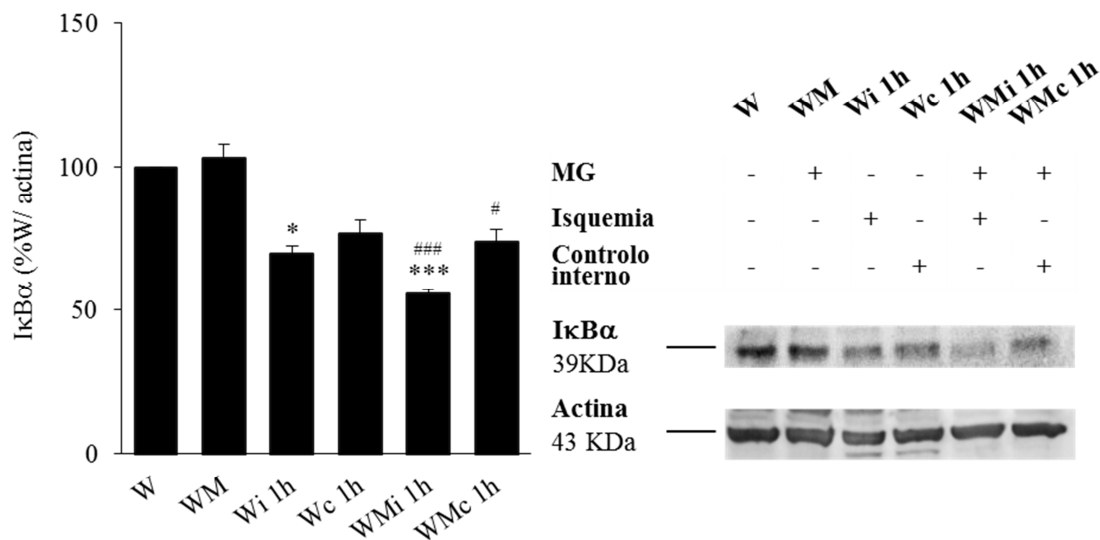


Figura 16: Expressão de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora; Wc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora; WMi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas; WMc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média \pm epm, $n=4$ /grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM. 1 símbolo $p < 0,05$; 3 símbolos $p < 0,001$.

Observou-se uma diminuição da forma total da Akt após a redução parcial da irrigação nos ratos *Wistar* (Wi 1h) em relação aos ratos controlo ($p < 0,05$). Baixos níveis de Akt foram também observados nos grupos WMi 1h e WMc 1h, quando comparados ao

grupo W ($p < 0,01$) e WM ($p < 0,05$) (Figura 17). A fosforilação da Akt constitui a sua activação e revelou-se aumentada de uma forma significativa nos controlos internos dos ratos *Wistar* sujeitos ao procedimento cirúrgico de redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal direito (Wc 1h), o que não foi observado no grupo WMc 1h sujeito à mesma condição. Este aumento da fosforilação da Akt foi significativo em relação aos grupos W ($p < 0,05$), WM ($p < 0,05$) e Wi 1h ($p < 0,01$) (Figura 17).

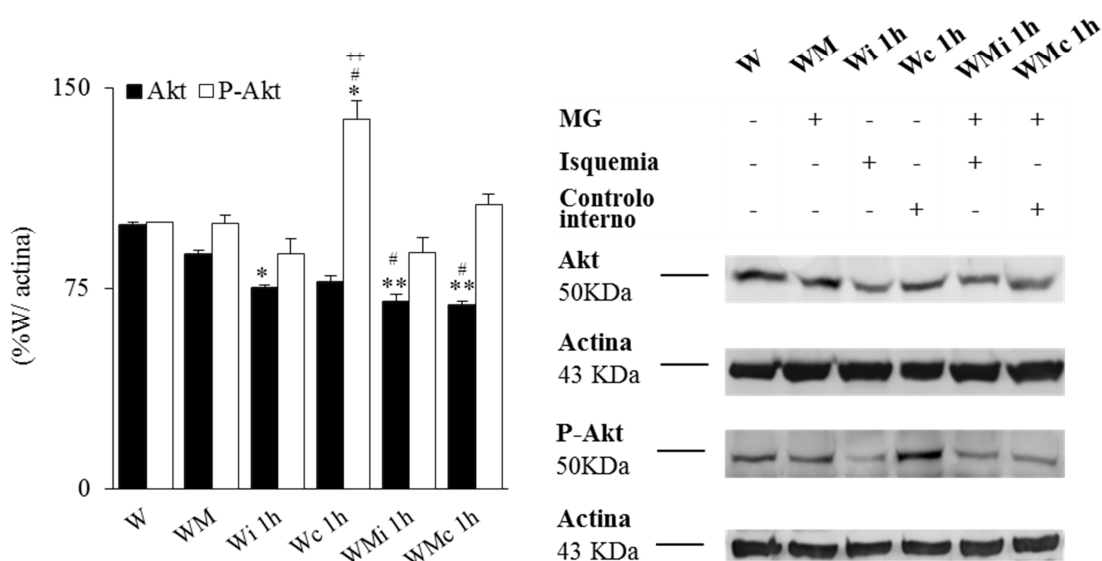


Figura 17: Expressão de Akt total e P-Akt no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora; Wc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora; WMI 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas; WMC 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média \pm epm, $n=4$ /grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM; + Diferente do grupo Wi 1h. 1 símbolo $p < 0,05$; 2 símbolos $p < 0,01$.

A indução de glicação pela administração de MG levou a um aumento da degradação de Perilipina A após a redução parcial da irrigação (WMI 1h), quando comparado aos grupos W e WM ($p < 0,01$). Um decréscimo significativo da Perilipina A foi também observado no controlo interno dos ratos sujeitos à administração de MG, em relação ao grupo controlo WM ($p < 0,05$) (Figura 18).

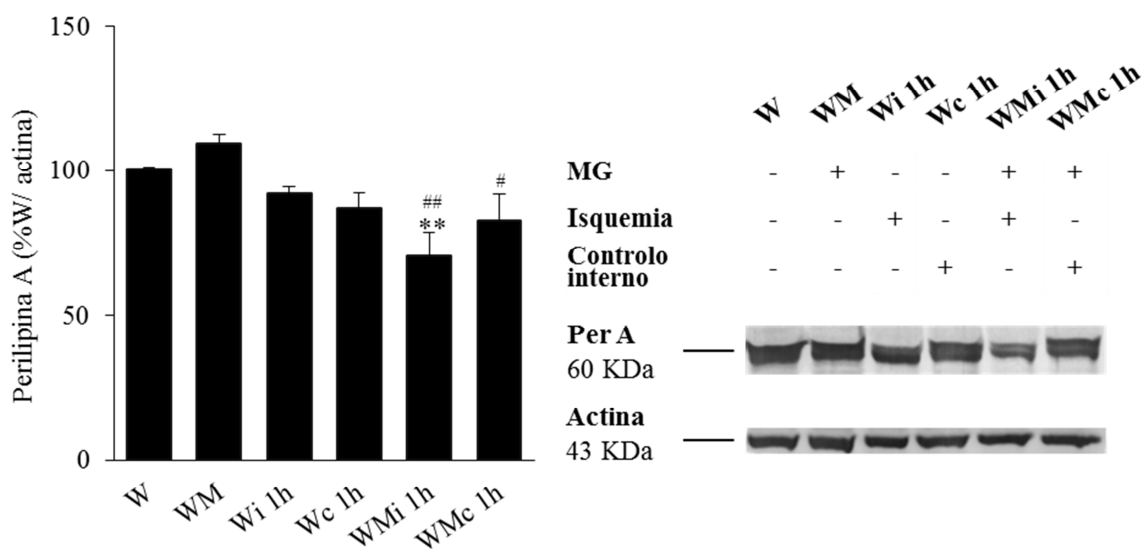


Figura 18: Expressão de Perilipina A no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 1 hora; Wc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora; WMI 1h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas; WMc 1h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 1 hora e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média ± epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM. 1 símbolo $p < 0,05$; 2 símbolos $p < 0,01$.

4.6. Sinalização do tecido adiposo epididimal após redução parcial da irrigação durante 48 horas

Com o intuito de assegurar que os efeitos observados nas adaptações metabólicas do tecido adiposo epididimal não se devem a uma redução da quantidade de células endoteliais, foi quantificado um marcador destas células, o CD 31. Assim, visto não haver alterações significativas nos diferentes grupos, pode assumir-se que as adaptações metabólicas se devem à administração de MG e à redução parcial da irrigação durante 48 horas, excluindo-se como possível explicação uma redução da quantidade de células endoteliais (figura 19).

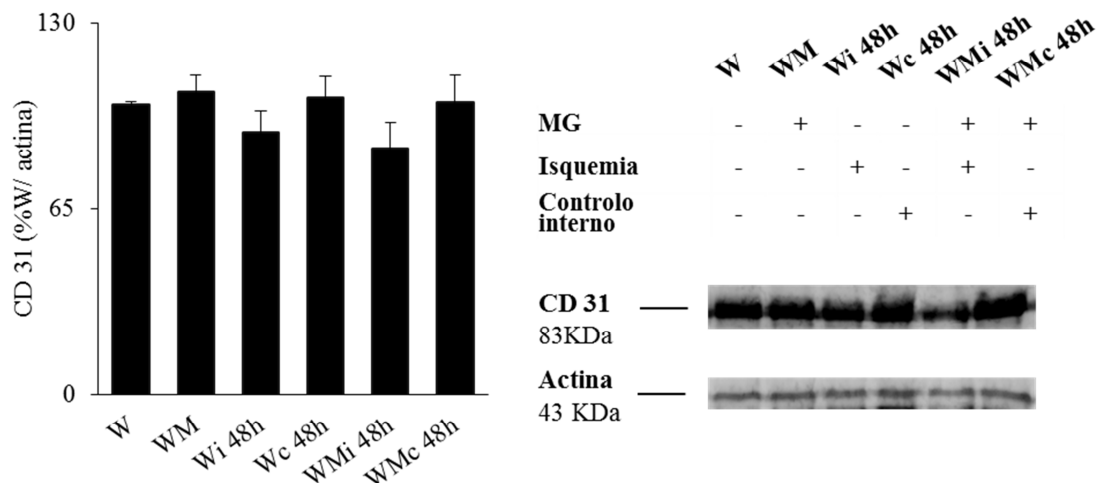


Figura 19: Expressão de CD31 no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas; Wc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WMi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas; WMc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média ± epm, n=4/grupo.

A redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal durante 48 horas, induziu, à semelhança do ocorrido com a redução parcial da irrigação de 1 hora, um decréscimo significativo dos níveis de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, no grupo sujeito à administração de MG, quando comparado ao grupo W ($p < 0,01$) e WM ($p < 0,05$) (Figura 20).

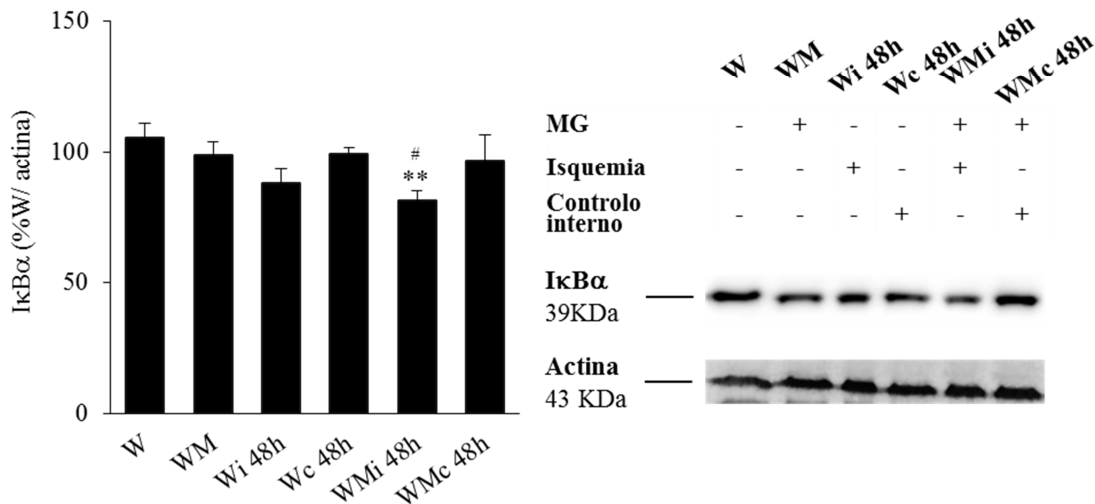


Figura 20: Expressão de IκBα no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas; Wc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WMi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas; WMc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média ± epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM. 1 símbolo p<0,05; 2 símbolos p<0,01.

Com a redução da irrigação de 48 horas, as diferenças observadas na Akt total foram atenuadas. Observou-se a abolição do aumento da forma fosforilada da Akt no controlo interno dos ratos *Wistar*, no final deste período de redução do fornecimento sanguíneo ao tecido adiposo epididimal esquerdo. No entanto, a redução parcial da irrigação nos ratos sujeitos à administração de MG causou um decréscimo significativo da forma fosforilada da Akt, em relação aos ratos *Wistar* (W) (p<0,05) (Figura 21).

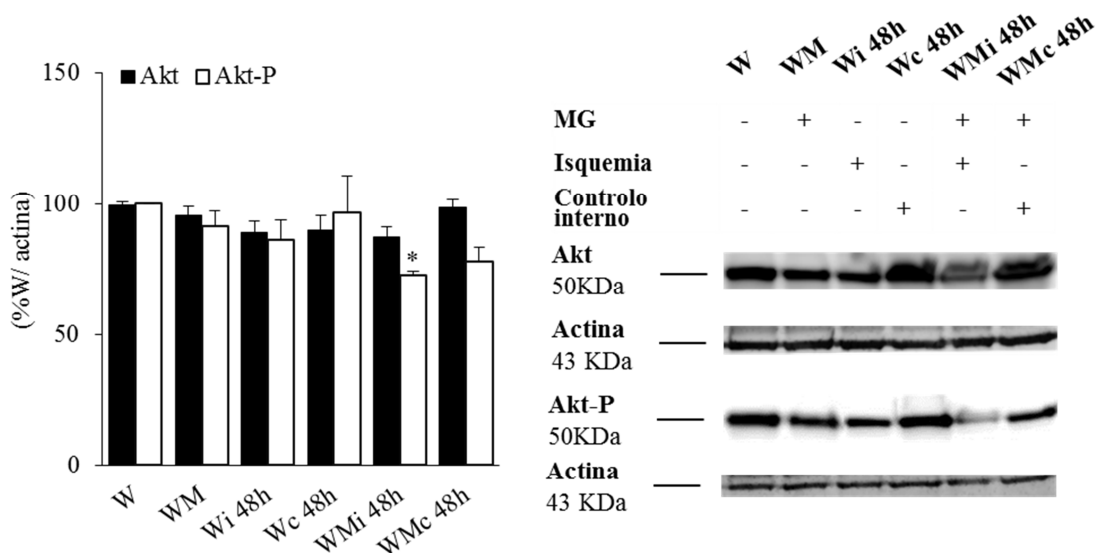


Figura 21: Expressão de Akt, P-Akt no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas; Wc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WMi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas; WMc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média ± epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W. 1 símbolo p<0,05.

Relativamente aos níveis de VEGF, foram observados aumentos em ambos os controlos internos. O controlo interno do grupo com redução parcial da irrigação durante 48 horas (Wc 48h), apresentou níveis superiores, comparado aos grupos W e WM (p<0,001). Seguidamente à administração de MG durante 8 semanas, a redução parcial da irrigação de 48 horas, induziu um aumento significativo dos níveis de VEGF no controlo interno (WMc 48h), em comparação aos grupos W, WM e WMi 48h (p<0,01) (Figura 22).

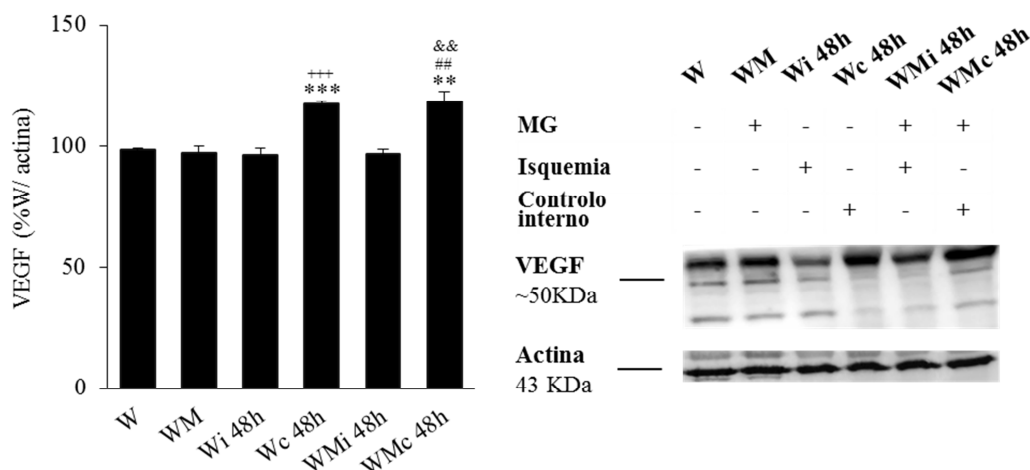


Figura 22: Expressão de VEGF no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas; Wc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WMi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas; WMc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média ± epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM; + Diferente do grupo Wi 48h; & Diferente do grupo WMi 48h. 2 símbolos p<0,01; 3 símbolos p<0,001.

O factor de transcrição PPAR γ é um importante marcador de função do tecido adiposo, controlando os níveis de adiponectina, bem como a expressão de Perilipina A. Após administração de MG, a redução parcial da irrigação (WMi 48h) levou a uma diminuição significativa da sua expressão, quando comparado aos grupos W (p<0,01), WM e Wi 48h (p<0,05). Observámos também, um decréscimo significativo da expressão de PPAR γ no controlo interno dos ratos sujeitos à administração de MG e à redução parcial da irrigação (WMc 48h), em relação ao grupo W (p<0,05) (Figura 23).

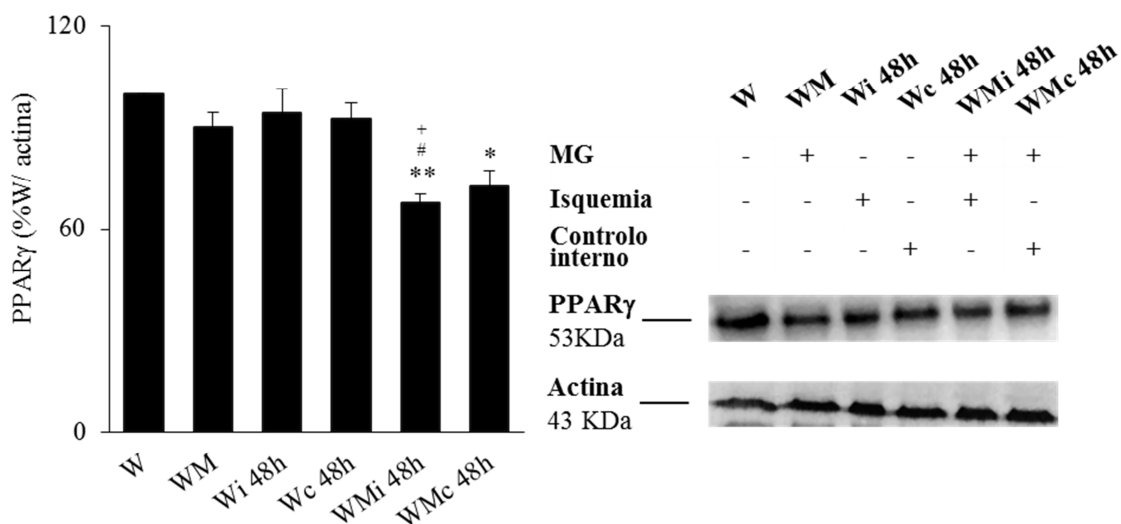


Figura 23: Expressão de PPAR γ no tecido adiposo epididimal, quantificada por *Western Blotting*.

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas; Wc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WMi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas; WMc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas.

Dados apresentados como média \pm epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM; + Diferente do grupo Wi 48h. 1 símbolo p<0,05; 2 símbolos p<0,01.

À semelhança do observado após a redução parcial da irrigação durante 1 hora, os níveis de Perilipina A foram significativamente inferiores no grupo WMi 48h, em comparação aos grupos W (p<0,01), WM (p<0,05) e Wi 48h (p<0,01), também observado por figuras ilustrativas de imunohistoquímica (Figura 24B). O controlo interno dos ratos tratados com MG (WMc 48h) apresentou níveis inferiores de Perilipina A, quando comparado ao grupo W e ao controlo interno dos ratos *Wistar* (Wc 48h) (p<0,05) (Figura 24A).

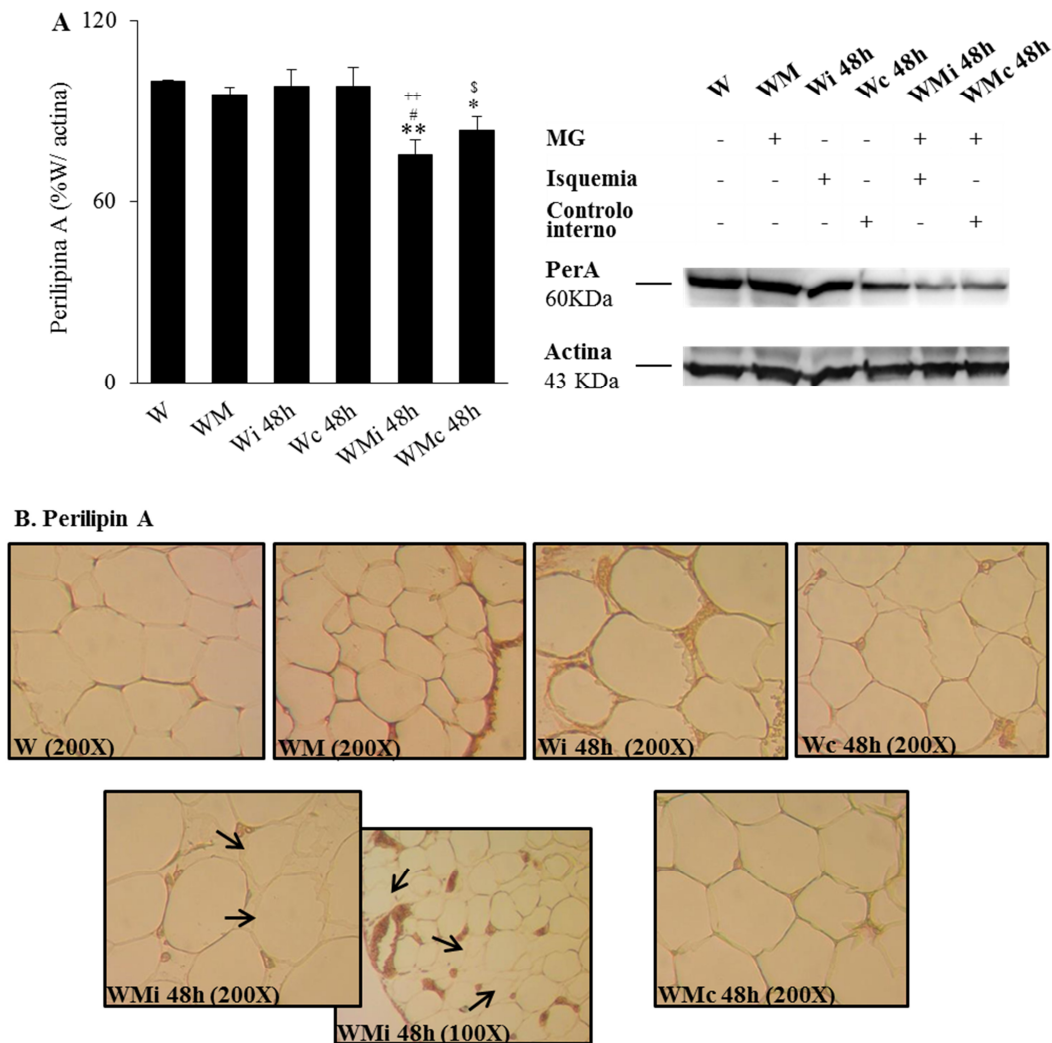


Figura 24: Expressão de Perilipina A no tecido adiposo epididimal quantificada por *Western Blotting* (A), bem como figuras ilustrativas da presença de Perilipina A, por imunohistoquímica (B).

W – Ratos *Wistar*; WM – Ratos *Wistar* com administração de MG durante 8 semanas; Wi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* normais com redução parcial da irrigação durante 48 horas; Wc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas; WMi 48h - Tecido adiposo epididimal esquerdo de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas; WMc 48h - Tecido adiposo epididimal direito de ratos *Wistar* com redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas e administração de MG durante 8 semanas. Figuras ilustrativas com ampliação de 100X e 200X.

Dados apresentados como média \pm epm, n=4/grupo.

* Diferente do grupo W; # Diferente do grupo WM; + Diferente do grupo Wi 48h. Diferente do grupo Wc 48h. 1 símbolo $p < 0,05$; 2 símbolos $p < 0,01$.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÃO

CAPÍTULO 5. Discussão

O impacto da hipoxia na disfunção do tecido adiposo e na consequente alteração do seu perfil de secreção, tem sido alvo de estudos recentes. Em várias descrições da literatura, com a hipertrofia do adipócito o volume desta célula é superior à distância máxima de difusão do oxigénio. Para além da incapacidade de difusão do oxigénio, a angiogénese e a vascularização estão comprometidas, características presentes na disfunção do tecido adiposo (Hosogai et al., 2007; Guilherme et al., 2008; Trayhurn et al., 2008a; Gaens et al., 2009; Regazzetti et al., 2009; Rutkowski et al., 2009; Maury and Brichard., 2010). Os mecanismos subjacentes à disfunção microvascular do tecido adiposo são ainda desconhecidos, mas sabe-se que estas alterações se relacionam com insulino-resistência e inflamação crónica (Goossens et al., 2011; Spencer et al., 2011; Tesauro & Cardillo., 2011; Bagi et al., 2012). Em humanos obesos, há alterações funcionais e estruturais das arteríolas do tecido adiposo subcutâneo, que se agravam na presença de diabetes tipo 2 (Georgescu et al., 2011). Recentemente, o nosso grupo mostrou que a glicação pode contribuir para a disfunção microvascular no tecido adiposo. Através da indução de glicação pela administração de metilglioxal (durante 14 semanas), foi possível visualizar alterações estruturais (deposição de produtos glicados, fibróticos e recrutamento de macrófagos para as regiões glicadas) na microvasculatura do tecido adiposo de ratos *Wistar* normais, com decréscimo da irrigação, e alterações de parâmetros apoptóticos e factores angiogénicos associadas a hipoadiponectinemia, mas sem implicações na sensibilidade à insulina (Matafome et al., 2012a). Já a administração menos prolongada de metilglioxal (8 semanas), causou alterações menos evidentes ao nível da rede vascular mas, ainda assim, induziu um aumento significativo da acumulação de AGEs no tecido adiposo. Contudo, não se observou

hipoadiponectinemia, expressão de moléculas quimioatrativas, nem recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (Rodrigues et al., 2013).

Neste estudo, em concreto, o nosso objectivo foi avaliar o papel da glicação nas adaptações metabólicas do tecido adiposo epididimal ao decréscimo do fornecimento sanguíneo, isolando os efeitos provenientes de outras variáveis inerentes aos fenótipos dos modelos obesos. Com este intuito, criámos um novo modelo de redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal, sendo esta uma característica, descrita na literatura, e comumente observada em indivíduos obesos, que apresentam uma redução parcial da irrigação na ordem dos 35% (Trayhurn & Wood., 2004; Goossens., 2008; Trayhurn et al., 2008b). Assim, a laqueação da artéria genital e da veia proveniente do tecido adiposo epididimal, resultou numa redução parcial da irrigação do tecido, mimetizando a redução observada em indivíduos obesos. O procedimento cirúrgico foi validado pela acumulação de *Evans Blue* (resultando em aproximadamente 55-60% da irrigação normal), que constitui um método fidedigno de avaliação e quantificação da irrigação, bem como da rede vascular (Bento et al., 2010; Matafome et al., 2012a).

No seguimento de estudos anteriores do nosso grupo (Matafome et al., 2012a, 2012b; Sena et al., 2012; Rodrigues et al., 2013), a administração de MG aumentou os níveis de AGEs no tecido adiposo e os níveis circulantes de ácidos gordos livres, mas não se verificou qualquer alteração no peso corporal, perfil glicémico, triglicérideos, colesterol total e adiponectina circulantes. A redução parcial do fornecimento sanguíneo do tecido adiposo epididimal esquerdo, durante 48 horas, causou um aumento significativo da glicemia em jejum e da insulinemia em ambos os grupos sujeitos ao procedimento cirúrgico (W 48h e WM 48h), sugerindo que o decréscimo da irrigação no tecido adiposo altera o armazenamento de glicose, levando assim a uma sobrecarga sistémica,

de forma independente da glicação (MG). Após 48 horas de decréscimo do fornecimento sanguíneo, os níveis de VEGF aumentaram significativamente no controlo interno de ambos os grupos, sugerindo uma resposta compensatória ao aumento sistémico dos níveis de insulina, de forma a aumentar a vascularização e assim permitir uma maior captação de glicose pelo tecido (Elias et al., 2012; Mannerås-Holm & Krook., 2012). Relativamente aos lípidos, o aumento dos níveis de ácidos gordos livres observado nos grupos tratados com MG foi consistente com os estudos anteriores do grupo, como já referido, alterações mantidas após a redução parcial da irrigação, durante 48 horas (WM 48h). A trigliceridemia aumentou somente no grupo de ratos *Wistar*, após a redução da irrigação (W 48h).

Após a administração de MG durante 8 semanas e redução parcial da irrigação durante 48 horas, observou-se um decréscimo significativo dos níveis de adiponectina (WM 48h). Estes eventos estão de acordo com relatos anteriores que referem a diminuição dos níveis de mRNA da adiponectina, em ratos obesos e em linhas celulares de adipócitos sujeitos à hipoxia (3T3-L1) (Hosogai et al., 2007; Chaiban et al., 2008).

Os mecanismos envolvidos no metabolismo do tecido adiposo foram avaliados 1 e 48 horas após a redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo na presença ou na ausência de glicação induzida pela administração de MG. Nos ratos tratados com MG, foi observada uma redução mais dramática dos níveis de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, 1 e 48 horas após a redução parcial da irrigação, resultado similar foi igualmente visível nos ratos *Wistar* após 1 hora (Wi 1h). Os factores de transcrição NF- κ B são complexados no citosol com proteínas inibitórias da família I κ B sendo que, quando ocorre degradação destas, há libertação do factor NF- κ B e consequente activação desta via, predominantemente inflamatória. Após 1 hora de redução parcial da irrigação, o grupo tratado com MG (W_{Mi} 1h) apresentou um aumento da p-ERK1/2 na sua forma activa

(fosforilada), mas não se verificou o mesmo para outras proteínas da família das MAP cinases, tais como JNK e p38. Foi descrito que a clivagem do PARP (marcador de apoptose), em células endoteliais, é dependente da activação das cinases ERK1/2, JNK e p38, sendo que a activação da JNK e da p38 está condicionada pelo estado celular de oxidação-redução. Por outro lado, a activação da ERK1/2 é independente do estado de oxidação-redução celular, sugerindo que possa constituir um mecanismo primário de resposta, enquanto que as outras MAP cinases (JNK e p38) podem ser activadas pelo aumento da deterioração do estado celular de oxidação-redução (Akhand et al., 2001; Heimfarth et al., 2013). Recentemente, os nossos colegas demonstraram uma activação da ERK1/2 em resposta à presença de 25-hidroxicolesterol (25-OH), consiste num passo essencial para a posterior activação do factor de transcrição NF- κ B e subsequente produção de IL-8 (Catarino et al., 2012). Também a exposição de células do mesângio glomerular a *AGE-cholesterol-aggregated-BSA*, induziu activação da ERK1/2, com a consequente expressão de *transforming growth factor- β* (TGF- β) e fibrose (Hirasawa et al., 2011). Foi demonstrado, *in vivo*, que a acumulação de AGEs origina um aumento da expressão do receptor RAGE, bem como activação da cinase ERK1/2 nas artérias coronária e renal em doentes diabéticos (Koka et al., 2006). Estes resultados, em vasos sanguíneos, sugerem um estado pro-inflamatório com activação do factor de transcrição NF- κ B, como foi também demonstrado em vários modelos de hipoxia e disfunção metabólica no tecido adiposo (Trayhurn and Wood., 2004; Rutkowski et al., 2009; Balistreri et al., 2010; Galic et al., 2010). Os nossos resultados sugerem que estes mecanismos podem ocorrer, em parte, devido à prévia activação da ERK1/2. Relativamente às adaptações metabólicas do tecido adiposo em resposta a um decréscimo da irrigação sanguínea, foi observada uma menor activação da cinase Akt nos ratos tratados com MG. Estes ratos mostraram uma menor activação da Akt nos

controles internos 1 hora após a redução parcial da irrigação e no tecido adiposo esquerdo após a redução da irrigação durante 48 horas. A activação da Akt nos controles internos dos *ratos Wistar* é consistente com o aumento sistémico dos níveis de insulina, mas retomam os valores normais 48 horas após a redução parcial da irrigação. Este aumento transitório não foi observado nos ratos tratados com MG. A Akt tem efeitos importantes na estimulação da captação de glicose pelos tecidos e na promoção da sobrevivência celular, estando descrita a sua acção inibitória directa na adenilciclase, uma conhecida activadora da degradação de Perilipina A (Berggreen et al., 2009; Omar et al., 2009). No seguimento destes factos, e em concordância, os níveis de Perilipina A mostraram-se diminuídos no tecido adiposo dos ratos tratados com MG e sujeitos à redução parcial da irrigação durante 1 e 48 horas; a análise histológica comprova a degradação de Perilipina A (vários adipócitos sem marcação envolvente), uma proteína de revestimento das gotas lipídicas, importante na protecção dos triglicerídeos da acção das lipases e, como tal, da sua hidrólise (lipólise). Além disso, a expressão de Perilipina A, assim como da adiponectina, é controlada pela actividade do factor de transcrição PPAR γ (Nunn et al., 2007; Guilherme et al., 2008). Em concordância, níveis diminuídos de PPAR γ foram observados no mesmo tecido adiposo dos ratos tratados com MG e com redução parcial da irrigação durante 48 horas. Sabe-se que o factor de transcrição NF- κ B se liga aos locais de ligação de resposta ao factor de transcrição PPAR γ , tendo assim um papel inibitório na actuação deste, com a consequente alteração na expressão génica (Juge-Aubry et al., 2005; Ye et al., 2007; Guilherme et al., 2008; Vázquez-Vela et al., 2008). Assim, estes eventos estão de acordo com os nossos resultados e podem justificar a descida dos níveis de Perilipina A, bem como de adiponectina.

Em condições de diminuição da irrigação no tecido adiposo, a acumulação de AGEs revelou-se prejudicial ao correcto metabolismo do adipócito, que se repercutiu a nível sistémico. Agregando estes resultados com os do passado, sugere-se que uma progressiva acumulação de AGEs no tecido adiposo, durante a expansão deste, contribui para a disfunção vascular e para uma adaptação metabólica incorrecta em condições de redução parcial da irrigação.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

CAPÍTULO 6. Conclusões

O modelo experimental desenvolvido resultou numa redução da irrigação de aproximadamente 45% no tecido adiposo epididimal esquerdo, sendo um método que mimetiza a diminuição do fornecimento sanguíneo descrito em indivíduos obesos, excluindo outras variáveis encontradas nos modelos de obesidade.

A redução parcial da irrigação do tecido adiposo epididimal esquerdo durante 48 horas teve repercussões a nível sistémico, nomeadamente no aumento significativo dos níveis de glicose e insulina em circulação.

A administração de metilglioxal induziu, adicionalmente, uma menor capacidade de adaptação metabólica do tecido adiposo epididimal, em condições de redução parcial da irrigação, com implicações no metabolismo.

No seu global, os nossos resultados sugerem que a progressiva acumulação de metilglioxal no tecido adiposo epididimal, durante a sua expansão, pode contribuir para disfunção microvascular e menor capacidade de adaptação metabólica. Estes eventos podem contribuir para a disfunção do tecido adiposo e assim potenciar a progressão da diabetes tipo 2. No entanto, estudos futuros serão necessários para comprovar esta hipótese.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akhand, A., Hossain, K., Mitsui, H., Kato, M., Miyata, T., Inagi, R., et al. (2001). Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for map family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine* 31: 20–30.
- Bagi, Z., Feher, A., and Cassuto, J. (2012). Microvascular responsiveness in obesity: implications for therapeutic intervention. *British Journal of Pharmacology* 165: 544–60.
- Balistreri, C.R., Caruso, C., and Candore, G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* 10: 1–19.
- Benito, M. (2011). Tissue specificity on insulin action and resistance: past to recent mechanisms. *Acta Physiologica (Oxford, England)* 201: 297–312.
- Bento, C.F., Fernandes, R., Matafome, P., Sena, C., Seica, R., and Pereira, P. (2010). Methylglyoxal-induced imbalance in the ratio of vascular endothelial growth factor to angiopoietin 2 secreted by retinal pigment epithelial cells leads to endothelial dysfunction. *Experimental Physiology* 95: 955–70.
- Berggreen, C., Gormand, A., Omar, B., Degerman, E., and Göransson, O. (2009). Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 296: E635–46.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615–25.
- Brownlee, M., and Brownlee (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–20.
- Bugianesi, E., McCullough, A.J., and Marchesini, G. (2005). Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42: 987–1000.
- Catarino, S., Bento, C.F., Brito, A., Murteira, E., Fernandes, A.F., and Pereira, P. (2012). Regulation of the expression of interleukin-8 induced by 25-hydroxycholesterol in retinal pigment epithelium cells. *Acta Ophthalmologica* 90: e255–63.
- Chaiban, J.T., Bitar, F.F., and Azar, S.T. (2008). Effect of chronic hypoxia on leptin, insulin, adiponectin, and ghrelin. *Metabolism: Clinical and Experimental* 57: 1019–22.
- Chan et al. (2007). Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. *Journal of Cellular Biochemistry* 100: 1056–69.
- Christiaens, V., and Lijnen, H.R. (2010). Angiogenesis and development of adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology* 318: 2–9.

- Cònsol, G., Moles, A., Ricart-Jané, D., and Llobera, M. (2005). An in situ perfusion protocol of rat epididymal adipose tissue useful in metabolic studies. *Journal of Lipid Research* 46: 1803–8.
- Desai, K.M., Chang, T., Wang, H., Banigesh, A., Dhar, A., Liu, J., et al. (2010). Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88: 273–84.
- Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews. Immunology* 11: 98–107.
- Elias, I., Franckhauser, S., Ferré, T., Vilà, L., Tafuro, S., Muñoz, S., et al. (2012). Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 61: 1801–13.
- Feinglos, M.N., and Bethel, M.A. (2008). *Type 2 Diabetes Mellitus: An Evidence-Based Approach to Practical Management* (Humana Press).
- Gaens, K.H.J., Ferreira, I., Kallen, C.J.H. van der, Greevenbroek, M.M.J. van, Blaak, E.E., Feskens, E.J.M., et al. (2009). Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94: 5174–80.
- Galic, S., Oakhill, J.S., and Steinberg, G.R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316: 129–39.
- Georgescu, A., Popov, D., Constantin, A., Nemezc, M., Alexandru, N., Cochior, D., et al. (2011). Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clinical Science* 120: 463–72.
- Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research* 107: 1058–70.
- Goldin, A., Beckman, J., Schmidt, A.M., and Creager, M. (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114: 597–605.
- Goossens, G.H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & Behavior* 94: 206–18.
- Goossens, G.H., Bizzarri, A., Venteclef, N., Essers, Y., Cleutjens, J.P., Konings, E., et al. (2011). Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation* 124: 67–76.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V, Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9: 367–77.

Gustafson, B. (2010). Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 17: 332–41.

Hausman, G.J., and Richardson, R.L. (2004). Adipose tissue angiogenesis The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : *Journal of Animal Science* 82: 925–934.

Heimfarth, L., Loureiro, S.O., Pierozan, P., Lima, B.O. de, Reis, K.P., Torres, E.B., et al. (2013). Methylglyoxal-induced cytotoxicity in neonatal rat brain: a role for oxidative stress and MAP kinases. *Metabolic Brain Disease*.

Hirasawa, Y., Sakai, T., Ito, M., Yoshimura, H., Feng, Y., and Nagamatsu, T. (2011). Advanced-glycation-end-product-cholesterol-aggregated-protein accelerates the proliferation of mesangial cells mediated by transforming-growth-factor-beta 1 receptors and the ERK-MAPK pathway. *European Journal of Pharmacology* 672: 159–68.

Hogan, P., Dall, T., and Nikolov, P. (2003). Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 26: 917–32.

Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., et al. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56: 901–11.

Houstis, N., Rosen, E.D., and Lander, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440: 944–8.

Ismail-Beigi, F. (2012). Pathogenesis and Glycemic Management of Type 2 Diabetes. *Arch Iran Med* 15: 239–246.

Jia, X., and Wu, L. (2007). Accumulation of endogenous methylglyoxal impaired insulin signaling in adipose tissue of fructose-fed rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 306: 133–139.

Juge-Aubry, C.E., Henrichot, E., and Meier, C. a (2005). Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 19: 547–66.

Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., and Matsuoka, T. (2010). Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation* 2010: 453892.

Kawahito, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology* 15: 4137.

Kiess, W., Petzold, S., Töpfer, M., Garten, A., Blüher, S., Kapellen, T., et al. (2008). Adipocytes and adipose tissue. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 22: 135–53.

- Kimura, R., Takahashi, N., Murota, K., Yamada, Y., Niiya, S., Kanzaki, N., et al. (2011). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) suppresses postprandial lipidemia through fatty acid oxidation in enterocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410: 1–6.
- Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., and Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 254: 86–99.
- Koka, V., Wang, W., Huang, X.R., Kim-Mitsuyama, S., Truong, L.D., and Lan, H.Y. (2006). Advanced Glycation End Products Activate a Chymase-Dependent Angiotensin II-Generating Pathway in Diabetic Complications. *Circulation* 113: 1353–1360.
- Lijnen, H.R. (2008). Angiogenesis and obesity. *Cardiovascular Research* 78: 286–93.
- Mannerås-Holm, L., and Krook, a (2012). Targeting adipose tissue angiogenesis to enhance insulin sensitivity. *Diabetologia* 55: 2562–4.
- Maillard, L (1912). Action Des Acides Aminés Sur Les Sucres. Formation Des Melanoidins Par Voie Methodique. *Compt. Rend* 154: pp. 66–68
- Matafome, P., Santos-Silva, D., Crisóstomo, J., Rodrigues, T., Rodrigues, L., Sena, C.M., et al. (2012a). Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry* 118: 58–68.
- Matafome, P., Sena, C., and Seíça, R. (2012b). Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine* 1–37.
- Mathys, K.C., Ponnampalam, S.N., Padival, S., and Nagaraj, R.H. (2002). for vascular complications in diabetes. 297: 863–869.
- Maury, E., and Brichard, S.M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 314: 1–16.
- Moeschel, K., Beck, A., Weigert, C., Lammers, R., Kalbacher, H., Voelter, W., et al. (2004). Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 25157–63.
- Natali, A., Toschi, E., Camastra, S., Gastaldelli, A., Groop, L., and Ferrannini, E. (2000). Determinants of postabsorptive endogenous glucose output in non-diabetic subjects. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetologia* 43: 1266–72.
- Neels, J.G., Thinnés, T., and Loskutoff, D.J. (2004). Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *The FASEB Journal* 19: 1–19.

- Negre-Salvayre, A., Salvayre, Robert, Augé, N., Pamplona, R., Portero-Otín, M., et al. (2009). Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & Redox Signaling 11*: 3071–109.
- Newsholme, P., Haber, E., and Hirabara, S. (2007). Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *Journal of Physiology*.
- Nunn, A.V., Bell, J., and Barter, P. (2007). The integration of lipid-sensing and anti-inflammatory effects: how the PPARs play a role in metabolic balance. *Nuclear Receptor 5*: 1–13.
- Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance.
- Omar, B., Zmuda-Trzebiatowska, E., Manganiello, V., Göransson, O., and Degerman, E. (2009). Regulation of AMP-activated protein kinase by cAMP in adipocytes: roles for phosphodiesterases, protein kinase B, protein kinase A, Epac and lipolysis. *Cellular Signalling 21*: 760–6.
- Plum, L., Belgardt, B.F., and Brüning, J.C. (2006). Review series Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *116*:
- Qatanani, M., and Lazar, M. a (2007). Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & Development 21*: 1443–55.
- Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2008). The dicarbonyl proteome: proteins susceptible to dicarbonyl glycation at functional sites in health, aging, and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences 1126*: 124–7.
- Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2012). Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids 42*: 1133–42.
- Rajala, M.W., and Scherer, P.E. (2003). Minireview: The Adipocyte--At the Crossroads of Energy Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis. *Endocrinology 144*: 3765–3773.
- Ram, V.J. (2003). Therapeutic significance of peroxisome proliferator-activated receptor modulators in diabetes. *Drugs of Today (Barcelona, Spain : 1998) 39*: 609–32.
- Regazzetti, C., Peraldi, P., Grémeaux, T., Najem-Lendom, R., Ben-Sahra, I., Cormont, M., et al. (2009). Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes 58*: 95–103.
- Rodrigues, Paulo, M., Santos-Silva, D., Sena, C., and Seica, R. (2013). Reduction of Methylglyoxal-Induced Glycation by Pyridoxamine Improves Adipose Tissue Microvascular Lesions. *Journal of Diabetes Researche 1*–9.

- Rutkowski, J.M., Davis, K.E., and Scherer, P.E. (2009). Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *The FEBS Journal* 276: 5738–46.
- Sena, C., Matafome, P., Crisóstomo, J., Rodrigues, L., Fernandes, R., Pereira, P., et al. (2012). Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacological Research : the Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 65: 497–506.
- Shaw, J.E., Sicree, R. a, and Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 87: 4–14.
- Spencer, M., Unal, R., Zhu, B., Rasouli, N., McGehee, R.E., Peterson, C. a, et al. (2011). Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96: E1990–8.
- Tang, W., Zeev, D., Suh, J.M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Robert, E., et al. (2008). White Fat Progenitors Reside in the Adipose Vasculature. *Science* 322: 583–586.
- Tesauro, M., and Cardillo, C. (2011). Obesity, blood vessels and metabolic syndrome. *Acta Physiologica (Oxford, England)* 203: 279–86.
- Thornalley, P.J., and Rabbani, N. (2011). Glyoxalase in tumourigenesis and multidrug resistance. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22: 318–25.
- Tilg, H., and Moschen, A.R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology* 6: 772–83.
- Trayhurn, P., Wang, B., and Wood, I.S. (2008a). Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. *Archives of Physiology and Biochemistry* 114: 267–76.
- Trayhurn, P., Wang, B., and Wood, I.S. (2008b). Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *The British Journal of Nutrition* 100: 227–35.
- Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition* 92: 347–355.
- Triplitt, C.L. (2012). Examining the mechanisms of glucose regulation. *The American Journal of Managed Care* 18: S4–10.
- Turner, R., Holman, R., Cull, C., and Stratton, I. (1998). blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837–853.
- Uden, P. Van, Kenneth, N.S., and Rocha, S. (2008). Regulation of hypoxia inducible factor-1 α by NF-kB. *Biochemical Journal*.

Vázquez-Vela, M.E.F., Torres, N., and Tovar, A.R. (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of Medical Research* 39: 715–28.

Virkamäki, A., Ueki, K., and Kahn, C.R. (1999). Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 103: 931–43.

Voziyan, P.A., and Hudson, B.G. (2005). Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 62: 1671–81.

Waltenberger, J. (2009). VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochemical Society Transactions* 37: 1167–70.

Wellen, K.E., and Hotamisligil, G.S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *112*: 1785–1788.

Wood, I.S., Heredia, F.P. de, Wang, B., and Trayhurn, P. (2009). Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society* 68: 370–7.

Xue, M., Rabbani, N., and Thornalley, P.J. (2011). Glyoxalase in ageing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 22: 293–301.

Ye, J. (2010). Emerging Role of Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Insulin Resistance. *International Journal of Obesity* 33: 235–247.

Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293: E1118–28.