

Diana Cristina Miguel Ribeiro

Efeito da cirurgia bariátrica na disfunção endotelial
associada à Diabetes *mellitus* tipo 2

Tese de Mestrado em Bioquímica

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Diana Cristina Miguel Ribeiro

Efeito da cirurgia bariátrica na disfunção endotelial associada à Diabetes *mellitus* tipo 2

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob orientação científica da Professora Doutora Cristina Sena e do Professor Doutor Paulo Santos (Universidade de Coimbra).

Coimbra 2016

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Cristina Sena, por todo o apoio, disponibilidade ajuda e motivação que demonstrou durante este ano, fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Raquel Seiça pela disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Agradeço sinceramente ao Doutor Paulo e futuro Doutor Tiago pela paciência e compreensão nos momentos mais difíceis e pelos bons momentos passados no laboratório.

À Daniela pela amizade dentro e fora do laboratório, pela ajuda e pela compreensão nos momentos mais difíceis.

À Catarina e à Elodie pelos bons momentos e pela amizade.

À Marina por estes anos de amizade, por ser uma boa ouvinte nos momentos menos bons e por estar presente em mais uma etapa importante da minha vida.

Agradeço aos meus pais pelo apoio, compreensão e motivação nas horas mais difíceis.

Aos meus tios, Sandra e Vitor, pela disponibilidade e ânimo que me deram mesmo quando não acreditava que fosse possível.

Ao Jorge pela disponibilidade, motivação, pelos conselhos e por acreditar sempre que iria conseguir.

A todos os meus amigos que sempre estiveram lá quando necessitei e certamente estarão em todas as etapas da minha vida.

A todos, o meu sincero obrigada!

Diana Cristina Miguel Ribeiro

Índice Geral

Índice de figuras.....	1
Índice de tabelas.....	3
Abreviaturas.....	4
Resumo.....	7
Abstract.....	9
I.Introdução.....	11
I.1 Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2.....	12
I.1.1 Obesidade.....	12
I.1.2 Tecido adiposo perivascular.....	13
I.1.2.1 Tecido adiposo perivascular: Função.....	15
I.1.2.2 Tecido adiposo perivascular: Condições patológicas.....	16
I.1.3 Resistência à insulina.....	16
I.1.4 Disfunção das células Beta pancreáticas.....	18
I.1.5 Complicações associadas à diabetes.....	19
I.2 Endotélio.....	20
I.2.1 Produção de Óxido Nítrico.....	21
I.2.2 Disfunção endotelial.....	23
I.2.3 Mecanismos associados à disfunção endotelial e Diabetes mellitus tipo 2.....	23
I.2.3.1 Hiperglicemia.....	23
I.2.3.2 Stress oxidativo.....	25
I.2.3.3 Ácidos gordos livres (FFAS).....	26
I.3 Cirurgia Bariátrica.....	27
I.3.1 Tipos de cirurgia.....	27
I.3.2 Cirurgia bariátrica na obesidade.....	27
I.3.3 Incretinas.....	28
I.3.4 Cirurgia bariátrica: gastrectomia vertical.....	30
I.3.5 Cirurgia bariátrica: Função endotelial.....	31
I.4 Objetivos.....	27
2. Material e Métodos.....	35
2.1 Materiais.....	36
2.1.1 Reagentes químicos e imunológicos.....	36

2.2 Modelos animais e tratamentos	37
2.2.1 Técnicas cirúrgicas.....	37
2.2.2 Peso corporal, glicemia e HbA _{1c}	38
2.2.3 Teste de tolerância à glicose e Teste de tolerância à insulina.....	38
2.2.4 Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos.....	39
2.2.5 Recolha de sangue.....	39
2.2.6 Sacrifício dos animais	39
2.2.7 Estudos de tensão isométrica.....	40
2.2.8 Níveis de <i>Stress Oxidativo</i>	40
2.2.9 Resultados e análise estatística.....	41
3. Resultados	42
3.1 Peso corporal, ingestão de ração e calórica, níveis de glicose em jejum	43
3.2 Perfil lipídico dos animais: Níveis séricos de colesterol total e Triglicerídeos.....	46
3.3 Níveis de glicose em jejum.....	47
3.4 Prova de tolerância à glicose e Prova de tolerância à insulina.....	47
3.5 Estudos funcionais.....	50
3.5.1 Relaxamento dependente e independente do endotélio	50
3.5.2 Contração em resposta a endotelina-I	52
3.6 <i>Stress oxidativo</i> na parede vascular: Sonda DHE	53
4. Discussão	55
5. Conclusão	63
6. Referências bibliográficas	66

Índice de figuras

- Figura 1:** Efeito do tecido adiposo perivascular na vasculatura em condições fisiológicas e patológicas. 12
- Figura 2:** Via de sinalização da insulina: à esquerda a via das MAPK responsável por efeitos como vasoconstrição, crescimento e mitogênese; à direita via da PI 3k que regula efeitos como a vasodilatação e a translocação dos transportadores GLUT-4. Painel B: Alteração e desequilíbrio das vias de sinalização da insulina causados pela resistência à insulina..... 15
- Figura 3:** Constituição da parede arterial. Esta é composta pela túnica íntima (endotélio), túnica média (células do músculo liso) e túnica externa (fibras de colagénio, terminações nervosas, fibroblastos e tecido adiposo perivascular). 17
- Figura 4:** A enzima (eNOS) responsável pela síntese de óxido nítrico nas células endoteliais pode ser ativada de forma dependente ou independente do cálcio.. 18
- Figura 5:** Mecanismos pelos quais a hiperglicemia induz danos vasculares20
- Figura 6:** Esquema ilustrativo do procedimento de restrição gastreectomia vertical ou Sleeve.....25
- Figura 7:** Peso corporal dos animais aos 4, 5 e aos 6 meses de idade. Na figura está representado o efeito da cirurgia e da dieta gorda no peso corporal dos animais diabéticos relativamente aos controlos Wistar (WIC).....36
- Figura 8:** Percentagem de ganho de peso dos animais entre os 4 e s 6 meses de idade. Na figura está representado o efeito da cirurgia e da dieta gorda no peso corporal dos animais diabéticos36
- Figura 9:** Glicémia dos animais após jejum de 12 horas, antes da cirurgia (4 meses) (painel A) e após a cirurgia (5 e 6 meses) (painel B). Na figura está representado o efeito da cirurgia e da dieta gorda nos níveis de glicose em jejum dos diferentes grupos de animais..47
- Figura 10:** Prova de tolerância intraperitoneal à glicose aos 4 meses de idade dos animais (painel A e B) e aos 6 meses de idade dos animais (painel C e D). Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicose ao longo da prova (120 minutos) e a respetiva área abaixo da curva (AUC).48

Figura 11: Prova de tolerância intraperitoneal à insulina aos 4 meses (painel A e B) e aos 6 meses de idade (painel C e D) dos animais. Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicose ao longo do período da prova (120 minutos) e a respectiva área abaixo da curva (AUC).....	49
Figura 12: Curvas concentração-efeito com acetilcolina (imagem A) e com nitroprussiato de sódio (imagem B).....	51
Figura 13: Curvas concentração-efeito com acetilcolina na presença de L- NAME.....	51
Figura 14: Curvas concentração-efeito em resposta a endotelina-I	52
Figura 15: Detecção <i>in situ</i> do anião superóxido, através de fluorescência vermelha, após incubação com a sonda DHE.....	53
Figura 16: Quantificação da fluorescência obtida pela detecção <i>in situ</i> do anião superóxido através da sonda DHE.	54

Índice de tabelas

Tabela 1 : Composição da dieta padrão usada neste trabalho.....	29
Tabela 2 : Composição da dieta gorda usada neste trabalho.....	29
Tabela 3 : Outros produtos usados neste trabalho.....	29
Tabela 4 : Peso corporal, correspondentes ao período pré-cirúrgico (4 meses) e pós-cirúrgico (6 meses), nos diferentes grupos de animais em estudo.	35
Tabela 5 : Ingestão calórica e ingestão de ração, correspondentes a 24 semanas, nos diferentes grupos em estudo.	37
Tabela 6 : Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, correspondentes ao período pré- cirúrgico (4 meses), nos diferentes grupos em estudo	38
Tabela 7 : Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos correspondentes ao período pós-cirúrgico (6 meses), nos diferentes grupos em estudo..	38

Abreviaturas

Ach	acetilcolina
AGEs	produtos finais de glicação avançada
Akt	proteína cinase B
AUC	área abaixo da curva
BAT	tecido adiposo castanho
BH4	tetra-hidrobioterina
BMI	índice de massa corporal
cGMP	monofosfato de guanidina cíclico
DAG	diacilglicerol
DHE	sonda di-hidroetídio
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	sintase de monóxido de azoto endotelial
ET-I	endotelina I
FFAS	ácidos gordos livres
GIP	peptídeo inibidor gástrico
GK	Goto-kakizaki
GLP-I	incretina semelhante ao glucagon
Glut	transportador de glucose
H₂O₂	peróxido de hidrogénio
HFD	dieta gorda
ICAM	molécula de adesão intracelular
iNOs	sintase de monóxido de azoto indutível
IRS	substrato do recetor da insulina

L-NAME	N ω Nitro-L-Arginina
MAPK	cinase das proteínas activadoras da mitogénese
NAPH	dinucleótido de nicotinamida e adenina (fosfato)
nNOS	sintase de monóxido de azoto neuronal
NO	monóxido de azoto ou óxido nítrico
NOS	sintase de monóxido de azoto ou óxido nítrico sintase
O₂	oxigénio
O₂⁻	anião superóxido
OH[·]	radical hidroxilo
PAI-I	inibidor do ativador de plasminogénio I
PGI₂	prostaciclina 2
Phe	fenilefrina
PI3K	fosfatidilinositol cinase na posição 3
PKC	proteína cinase C
PTIG	prova de tolerância intraperitoneal à glucose
PTII	prova de tolerância intraperitoneal à insulina
PVAT	tecido adiposo perivascular
PVCFs	fatores de contração derivados do tecido adiposo perivascular
PVRF	fatores de relaxamento derivados do tecido adiposo perivascular
PYY	peptídeo tirosina tirosina
RAGEs	receptores de produtos finais de glicação avançada
ROS	espécies reativas de oxigénio
sGC	guanilato ciclase solúvel
SNP	nitroprussiato de sódio
SVF	fração vascular estromal

VCAM molécula de adesão das células vasculares

WAT tecido adiposo

Resumo

A Diabetes *mellitus* tipo 2 é uma patologia caracterizada por uma hiperglicemia crônica acompanhada de um estado de insulino resistência, com prevalência crescente a nível mundial. Nesta patologia surgem inúmeras complicações, nomeadamente ao nível macro e microvascular. Todas elas apresentam um denominador comum, a disfunção endotelial. Esta precede o desenvolvimento das doenças macrovasculares e caracteriza-se essencialmente pela reduzida biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e para a propensão para um ambiente pró-contrátil e pró-oxidativo.

Apesar das várias terapêuticas já existentes todas elas apresentam limitações no controlo das complicações vasculares, sendo necessário a pesquisa de novas abordagens. Neste contexto, a cirurgia bariátrica, utilizada para reduzir o peso em casos de obesidade mórbida, destacou-se pelo seu potencial na redução do peso e controlo glicémico da diabetes *mellitus* tipo 2, passando a ser designada de cirurgia metabólica.

No entanto, apesar do claro sucesso na remissão da diabetes *mellitus* em casos de obesidade, estão ainda por esclarecer os principais mecanismos de ação e o seu impacto nas complicações vasculares.

Este trabalho teve como objetivo o estudo do potencial terapêutico da cirurgia bariátrica (neste caso um procedimento restritivo – a gastrectomia vertical) na Diabetes *mellitus* tipo 2, nomeadamente ao nível da disfunção endotelial num modelo animal com Diabetes *mellitus* tipo 2 não obeso (ratos Goto-Kakizaki) mantido com uma dieta rica em gordura.

Para isso, foram avaliados diferentes grupos de ratos: o grupo controlo (ratos Wistar com uma dieta *standard*), o grupo GK (ratos Goto-kakizaki com uma dieta *standard*), o grupo GKHFD (ratos Goto-kakizaki submetidos a uma dieta rica em gordura), o grupo GKHFDSS (ratos Goto-Kakizaki submetidos a uma dieta rica em gordura e à cirurgia placebo “sham”) e o grupo GKHFDSG (ratos Goto-Kakizaki submetidos a uma dieta rica em gordura e à cirurgia bariátrica “sleeve” — gastrectomia vertical).

Foram avaliados os diferentes parâmetros destes grupos de animais como a evolução do peso corporal, a quantidade de ração ingerida, o perfil lipídico (níveis séricos de colesterol total e triglicéridos), a sua tolerância à glicose (Prova de tolerância intraperitoneal à glicose) e a sua sensibilidade à insulina (prova de tolerância intraperitoneal à insulina), bem como os níveis de *stress* oxidativo através de uma técnica

de imunofluorescência. Por fim, foi efetuada a caracterização funcional da artéria aorta nos diferentes grupos de animais.

Verificámos que a cirurgia bariátrica provoca uma diminuição no peso corporal dos animais, melhora o perfil lipídico, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, e reduz significativamente os níveis de *stress* oxidativo melhorando a função endotelial.

Esta gastrectomia apresenta um potente efeito na promoção da função endotelial bem como na redução dos níveis vasculares de anião superóxido sendo, por isso, uma terapia promissora neste tipo de patologia.

Palavras-Chave: Diabetes *mellitus* tipo 2, disfunção endotelial, complicações macrovasculares, cirurgia bariátrica, gastrectomia vertical.

Abstract

Type 2 diabetes *mellitus* is a disorder characterized by chronic hyperglycemia accompanied by a state of insulin resistance, with increasing prevalence worldwide.

In this disorder, numerous complications arise, particularly at the macro and microvascular level. All of them have a common denominator, endothelial dysfunction. It precedes the development of macrovascular disease and it is characterized by poor bioavailability of nitric oxide (NO) and the propensity of a pro-contractile and pro-oxidative environment.

Despite the various existing therapeutics all have limitations regarding vascular complications and the research for new approaches is required. In this context bariatric surgery used as a means of reducing weight in case of morbid obesity, as a crucial potential in remission of type 2 diabetes *mellitus*, going to be called metabolic surgery.

However despite de success in the remission of the disease in cases of morbid obesity, it is yet to clarify the mechanisms of action of surgery in type 2 diabetes mellitus and the outcome at the vascular level.

This work aimed to study the therapeutic potential of bariatric surgery, in this case the restrictive procedure: sleeve, in type 2 diabetes mellitus, particularly in terms of endothelial dysfunction in an animal model with type 2 diabetes mellitus and nonobese (Goto-Kakizaki rats), fed with high fat diet.

For this, were evaluated different groups of rats: control group (Wistar rats with standard diet), GK group (Goto-Kakizaki rats with standard diet), GKHFD group (Goto-Kakizaki rats with high fat diet), GKHFDSS group (Goto-Kakizaki rats with high fat diet and underwent to sham surgery) and GKHFDSG (Goto-kakizaki rats with high fat diet and underwent to sleeve gastrectomy surgery).

Different parameters of these groups of animals were evaluated: variation of body weight, amount of food ingested, lipid profile (serum total cholesterol and triglycerides), glucose tolerance (Intraperitoneal glucose tolerance test), insulin sensibility (intraperitoneal insulin tolerance test) and vascular oxidative stress levels with an immunofluorescence technique.

Finally, the functional characterization of the aorta artery in different animals groups was also performed.

We conclude that sleeve gastrectomy causes a decrease in animals' body weight

and improves triglyceride profile, glucose tolerance and insulin sensibility, and reduce vascular oxidative stress levels, and improves the endothelial function.

Sleeve gastrectomy has a potent effect in promoting endothelial function and has antioxidant properties, it is therefore a promising therapy in this type of disease.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, endothelial dysfunction, macrovascular disease, bariatric surgery, sleeve gastrectomy.

I. Introdução

I.1 Diabetes Mellitus tipo 2

A diabetes *mellitus* é uma patologia que tende a ganhar cada vez maiores proporções, sendo a sua prevalência global, em adultos, no ano de 2013 de 8.3% (382 milhões de pessoas), tendo este número tendência para aumentar para as 592 milhões de pessoas até 2035 (International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 6th ed, 2013).

O termo diabetes *mellitus* descreve um conjunto de desordens metabólicas com múltipla etiologia, caracterizada essencialmente pela hiperglicemia crónica associada a distúrbios no metabolismo de proteínas, hidratos de carbono e lípidos, o que culmina em defeitos na secreção e ação da insulina ou ambos (DeFronzo *et al.*, 2015).

A diabetes *mellitus* tipo 2 ou não insulino dependente é a forma mais comum desta doença. Esta caracteriza-se pela resistência dos tecidos insulino dependentes (tecido adiposo, fígado e músculo esquelético) à ação da insulina e pela deficiente secreção desta hormona pelas células beta pancreáticas.

Nesta patologia a capacidade de produção de insulina mantém-se (pelo menos em estágios precoces da doença), no entanto vários processos induzem anormalidades na forma de produção e na ação desta hormona (Nowotny *et al.*, 2015).

Inicialmente, estes indivíduos não necessitam de tratamento com insulina para sobreviver, com o agravamento da doença, torna-se necessário recorrer a este tipo de tratamento. As razões para o desenvolvimento desta doença permanecem desconhecidas, no entanto são conhecidos alguns fatores de risco que podem desencadear este tipo de diabetes, como a obesidade, idade, sedentarismo, fatores ambientais entre outros (American Diabetes Association, 2004).

I.1.1 Obesidade

Uma grande proporção dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 são obesos, sendo a obesidade considerado o maior fator de risco para o desenvolvimento desta patologia.

O tecido adiposo produz várias substâncias que afetam o metabolismo tais como: hormonas, glicerol, adipocinas, substâncias inflamatórias e ácidos gordos livres (FFAS). Em condições de obesidade há uma maior predominância deste tipo de tecido, pelo que, a libertação destas substâncias é mais acentuada (Khan *et al.*, 2014).

Os FFAS resultam da lipólise dos triglicerídeos armazenados nos adipócitos, estes

circulam na corrente sanguínea ligados à albumina e são utilizados como fonte de energia por órgãos como o fígado e o coração, em estados de jejum (Karpe *et al.*, 2011).

Quando a capacidade de armazenamento dos adipócitos é ultrapassada, os FFAS acumulam-se no fígado e no músculo, onde permanecem em constante “turnover” o que gera metabolitos (acyl coenzimas, diacilglicerol, ceramidas etc.) que provocam resistência à insulina e prejudicam a sua libertação (Bays *et al.*, 2004). Estas características estão tipicamente associadas a patologias como a diabetes *mellitus* tipo 2.

Nesta condição patológica, o metabolismo dos adipócitos está desregulado o que provoca aumento dos FFAS em circulação, devido à resistência ao efeito anti lipolítico da insulina, e consequentemente insulino-resistência hepática e muscular, conduzindo a lipotoxicidade. Para além disto, a disfunção dos adipócitos leva ao excesso de produção de fatores que causam insulino - resistência, inflamação e processos ateroscleróticos e diminuição da produção de fatores que promovem a sensibilidade à insulina (Bays *et al.*, 2004).

Em suma, a maioria dos diabéticos tipo 2 têm excesso de tecido adiposo, uma anormal distribuição deste tecido (predominante no fígado, músculo e adipócitos viscerais) e adipócitos insulino resistentes com a capacidade de armazenamento de triglicerídeos comprometida. Esta disfunção das células adiposas irá desencadear uma série de fatores tipicamente associados a esta condição: Inflamação, resistência a insulina entre outros.

1.1.2 Tecido adiposo perivascular

O tecido adiposo é usualmente classificado como tecido adiposo castanho (BAT) e tecido adiposo branco (WAT). O primeiro está relacionado com a termogénese e é constituído por adipócitos metabolicamente ativos, enquanto o segundo funciona como armazenamento lipídico, é menos vascularizado e possui atividade metabólica reduzida (Szasz and Webb, 2012).

A maioria dos vasos sanguíneos à exceção da circulação cerebral está rodeada por tecido adiposo perivascular (PVAT), este localiza-se exteriormente à túnica adventícia e não há qualquer barreira evidente na separação de ambos. As suas características diferem dependendo do tipo de vaso que rodeia uma vez que ao nível da aorta apresenta-se como uma mistura entre BAT e WAT enquanto ao nível das mesentéricas é maioritariamente WAT. A sua vascularização também varia de acordo com a localização o que explica as variações nas características do PVAT (Brown *et al.*, 2014).

I. Introdução

Este tipo de tecido adiposo, tal como o endotélio foi durante muito tempo considerado apenas como uma estrutura de suporte inerte, sendo removido na maioria dos estudos funcionais. No entanto, atualmente reconhece-se a sua atividade de secreção de várias moléculas vasoativas que atuam a nível endócrino e parácrino (Szasz *et al.*, 2013).

Os adipócitos são a população de células mais abundante neste tipo de tecido, estes secretam adipocinas que podem ser classificadas como pró-inflamatórias (leptina, resistina) ou anti-inflamatórias (adiponectina).

Para além dos adipócitos o PVAT é constituído também por outras células que constituem a fração vascular estromal (SVF), estas incluem fibroblastos, células estaminais mesenquimais, linfócitos, macrófagos, e células endoteliais que acompanham outras estruturas como a vasa vasorum. Todas estas células com diferentes características são determinantes na libertação dos fatores vasoativos pelo PVAT (Szasz *et al.*, 2013).

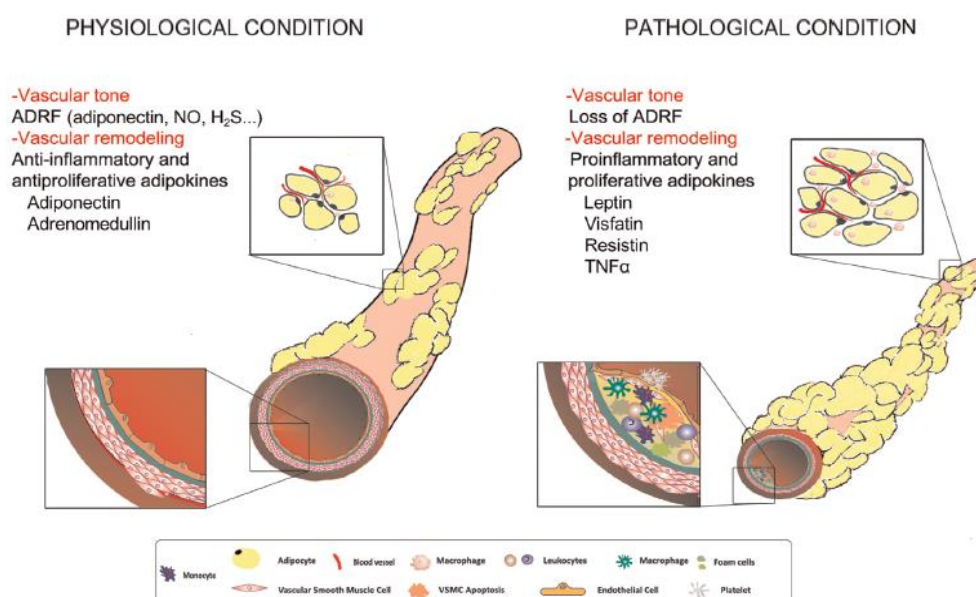


Figura I: Efeito do tecido adiposo perivascular na vasculatura em condições fisiológicas e patológicas (Adaptado de (Ozen *et al.*, 2015)).

I.1.2.1 Tecido adiposo perivascular: Função

Ação vasodilatadora

Para além da sua função de proteção e suporte da vasculatura, o PVAT atua na regulação do tónus vascular através da promoção do relaxamento das células do músculo liso vascular (VSMC). Esta ação anti-contrátil é desempenhada por um fator de relaxamento perivascular (PVRF) libertado pelo PVAT (Lohn *et al.*, 2002).

Atualmente é desconhecida a identidade deste fator ou conjunto de fatores sabe-se apenas que a sua libertação é dependente de cálcio, o seu efeito anti-contrátil pode ser dependente do endotélio sendo mediado pelo óxido nítrico (NO) que leva à abertura dos canais de potássio (K^+) (Lee RM,2009) ou independente mediada pela abertura dos canais de K^+ , ou pela formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Verlohren *et al.*,2004) no endotélio e a sua ação é mediada pela via tirosina-cinase (Lohn *et al.*, 2002).

Contudo, existem já alguns candidatos susceptíveis ao desempenho deste papel como o H_2O_2 , o hidrogénio sulfido, a adiponectina, e a leptina (Gulsev Ozen *et al.*, 2015).

Ação vasoconstritora

A libertação de substâncias vasodilatadoras pelo PVAT está já descrita, no entanto, este tecido atua na manutenção da homeostase vascular também através da libertação de substâncias vasoconstritoras (PVCFs) cuja identidade é ainda desconhecida (Gao *et al.*, 2006).

Sabe-se que o PVAT promove a vasoconstrição através da inibição da produção de NO pelo endotélio e do aumento da proteína caveolina-1 responsável por manter a enzima (eNOS) responsável pela produção de NO na sua forma inativa (Lee *et al.*, 2014). Em suma, o PVAT promove a libertação equilibrada de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras essenciais para a manutenção da homeostase vascular em condições fisiológicas.

As células que constituem o PVAT, para além destes compostos vasoativos, libertam também outros grupos de substâncias que atuam a nível parácrino e endócrino. Estas englobam hormonas, citocinas, quimocinas entre outras. Este tipo de tecido adiposo é também a fonte predominante de moléculas pró-inflamatórias que estão relacionadas com o desenvolvimento de inflamação na parede vascular, os macrófagos e linfócitos T presentes no PVAT ou recrutados pelos adipócitos contribuem também para a regulação

da resposta inflamatória a estímulos externos.

O PVAT constitui uma fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido e peróxido de hidrogênio através da expressão de NAPH oxidases e de outras moléculas gasosas como o sulfeto de hidrogênio (H₂S) (Szasz and Webb 2012; Meijer *et al.*, 2011).

1.1.2.2 Tecido adiposo perivascular: Condições patológicas

Em condições patológicas como a obesidade e a diabetes o PVAT sofre alterações estruturais e funcionais que estão diretamente relacionadas com a disfunção endotelial e o dano vascular. Nestas condições, ocorre não só o aumento da massa de PVAT mas também o desequilíbrio na sua função secretora o que compromete a homeostase vascular (Alfonso *et al.*, 2013).

Este desequilíbrio, culmina na perda da função anti-contrátil induzida pelo PVRF, que pode ser devida ao aumento do *stress* oxidativo causado pelas ROS, característico de patologias como a obesidade e a diabetes. Outro mecanismo é a infiltração de macrófagos que se observa no tecido adiposo em vários estados patológicos (Oriowo, 2015).

A própria obesidade está associada a um ligeiro grau de inflamação que vai despoletar uma série de eventos que culmina na disfunção endotelial.

Em suma, em caso de patologia os fatores secretados pelas células do PVAT deixam de estar equilibrados é perdida a homeostase vascular sendo a principal característica a perda do seu efeito anti – contrátil. Este tecido apresenta um papel benéfico e protetor em condições fisiológicas que caso de patologias se converte num papel deletório contribuindo para a inflamação e para o favorecimento de um estado pró-contrátil (Ozen *et al.*, 2015).

1.1.3 Resistência à insulina

A insulina é uma hormona peptídica anabólica essencial para a regulação do metabolismo (glicose, proteínas e lípidos), crescimento e diferenciação celular. Para além da sua função na absorção da glicose pelos tecidos (músculo esquelético e tecido adiposo) e inibição da gliconeogénese no fígado, esta desempenha funções cruciais ao nível vascular, através da estimulação da produção do potente vasodilatador: NO (Muniyappa and Sowers, 2013).

I. Introdução

As suas ações biológicas iniciam-se quando esta se liga ao seu recetor na superfície celular (IR), o que conseqüentemente provoca a sua auto-fosforilação, isto aumenta a sua atividade intrínseca de tirosina cinase o que resulta numa cascata de fosforilação de proteínas sinalizadoras como o substrato do receptor (IRS) (Kim *et al.*, 2006). Consideram-se duas principais vias de sinalização da insulina: A via dependente de PI3K que medeia as ações metabólicas e vasculares da insulina e a via dependente da MAPK que medeia a ação da insulina na mitogénese e crescimento celular.

A função primária que distingue a insulina dos outros fatores de crescimento é a promoção de utilização de glicose por todo o corpo, através da translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) (DeFronzo, 2010).

Um outro papel fundamental da insulina é a sua função vasodilatadora, pois esta estimula a produção de NO, um potente vasodilatador, pelas células vasculares endoteliais (Muniyappa *et al.*, 2015).

Na vasculatura a insulina promove a vasodilatação através do estímulo da produção de NO, que ocorre através da ativação da via PI3K, através desta via ocorre fosforilação da eNOS no resíduo Ser 1176 pela proteína AKT, isto culmina no aumento da atividade da enzima e conseqüentemente na produção de NO (Hartell *et al.*, 2004).

Pelo contrário, a ativação da via MAPK leva a produção de vasoconstritores como a ET-1 e de moléculas de adesão como a VCAM e E-seletina pelo endotélio dos vasos, sendo que o equilíbrio entre as duas vias é essencial para a manutenção da homeostase vascular e para a regulação da resposta vascular à insulina (Potenza *et al.*, 2009).

A resistência à insulina define-se como a incapacidade da insulina para promover a normal homeostase da glicose. Ou seja, há a incapacidade da insulina para promover a tomada de glicose pelas células hepáticas e pelo músculo esquelético e para suprimir a produção de glicose hepática. Nestas condições, são necessárias maiores concentrações de insulina para manter a euglicemia e para ocorrer a utilização normal de glicose pelos tecidos (Kieren J. Mather *et al.*, 2013).

Os estados de insulino resistência são acompanhados pela redução da atividade da via PI3K enquanto a via MAPK permanece intacta ou aumentada. A hiperinsulinemia acompanha estes estados, uma vez que se trata de um mecanismo compensatório para manter a euglicemia, esta causa danos na PI3K. Ao nível do endotélio, o desequilíbrio destas vias aumenta a produção de vasoconstritores, característica principal da disfunção endotelial (Muniyappa and Sowers, 2013).

I. Introdução

O estado de insulino-resistência está relacionado com fatores como a glucotoxicidade e a lipotoxicidade estes aumentam a produção de DAG (diacilglicerol) e ceramidas. Ao nível vascular, o DAG ativa isoformas da proteína cinase C o que inibe os efeitos da insulina e culmina em disfunção endotelial (Camila Manrique *et al.*,2014).

A resistência à tomada de glicose estimulada pela insulina é um fenómeno comum e tem um papel central na patogénese e no desenvolvimento clínico de várias doenças como a diabetes *mellitus* tipo 2.

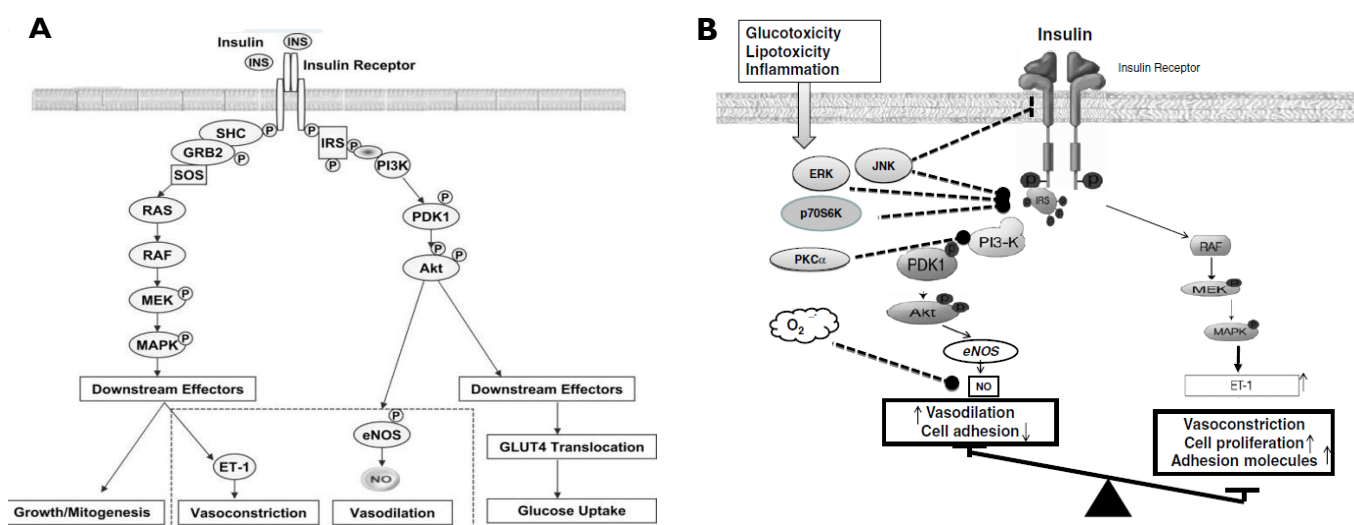


Figura 2: Painel A: Via de sinalização da insulina: a via das MAPK responsável por efeitos como vasoconstrição, crescimento e mitogénese; a via da PI 3k que regula efeitos como a vasodilatação e a translocação dos transportadores GLUT-4 (Adaptado de (Muniyappa *et al.*,2008)). **Painel B:** Alteração e desequilíbrio das vias de sinalização da insulina causados pela resistência à insulina (Adaptado de (Muniyappa and Sowers 2013)).

I.1.4 Disfunção das células Beta pancreáticas

As células beta constituem um tipo de células pancreáticas presentes nos ilhéus de Langerhans localizados na porção endócrina do pâncreas. Estas células respondem a vários nutrientes presentes na circulação sanguínea, no entanto, a resposta predominante acontece com a glicose, que entra por difusão facilitada através do transportador de glicose (GLUT-2) presente nestas células, e promove a secreção de uma hormona fundamental à homeostase do organismo, a insulina (Joslin Diabetes Center, 2004; Zhuo Fu *et al.*, 2013).

Em casos de patologia, como na diabetes *mellitus* tipo 2, o controlo da glicemia depende quer do número total destas células quer da sua capacidade secretora.

Inicialmente, para compensar a insulino – resistência, presente em casos de diabetes, ocorre o aumento da produção e secreção de insulina e do número de células beta. No entanto, as células começam a entrar em *stress*, levando à falência deste mecanismo compensatório e à progressão da doença (Guelho *et al.*, 2015). Em estágios precoces da diabetes mellitus observa-se uma redução de 25 a 50% da massa de células beta e mais tarde com a progressão da doença a apoptose destas células é o maior responsável pelo seu agravamento (Chang-Chen *et al.*, 2008).

Existem vários mecanismos associados à disfunção e posterior falência das células beta pancreáticas como o aumento da concentração de glicose no sangue (hiperglicemia) e de ácidos gordos livres, o grau de insulino-resistência, a acumulação pancreática do peptídeo amilóide e o aumento do *stress* oxidativo. O fator mais relevante para a apoptose destas células é a toxicidade causada pela hiperglicemia crónica e pelo aumento dos ácidos gordos livres (glucolipotoxicidade) (Poitout V and Robertson, 2008).

Em suma, a disfunção das células beta pancreáticas resulta da interação simultânea de vários mecanismos associados, que promovem a deterioração da função destas células ao longo da progressão da doença (Saisho, 2015).

1.1.5 Complicações associadas à diabetes

A diabetes *mellitus* tipo 2 está intimamente relacionada com complicações vasculares que afetam negativamente a qualidade de vida do paciente, levando à morte em alguns casos (Ahmed *et al.*, 2010).

Um dos fatores determinantes para o aparecimento destas complicações é a hiperglicemia prolongada característica da diabetes *mellitus* tipo 2. Esta leva ao surgimento de complicações microvasculares, como a retinopatia e nefropatia, e macrovasculares como a doença coronária arterial e periférica, sendo que o mecanismo principal deste tipo de complicações é o desenvolvimento de aterosclerose, que promove o estreitamento das paredes arteriais de todo o corpo (Fowler, 2008).

A hiperglicemia prolongada culmina neste tipo de complicações através de vários mecanismos como o aumento do fluxo de glicose e outros açúcares através da via dos pólios, o aumento da formação intracelular de produtos de glicação avançada (AGEs) e o aumento da expressão do seu recetor (RAGE), a ativação de isoformas da proteína cinase C (PKC) e a expressão aumentada da via das hexosaminas (Giacco and Brownlee, 2010).

Estes mecanismos estão todos interligados pelo aumento da produção de ROS,

que interagem com outras moléculas e resulta em dano.

Esta série de eventos que ocorrem na parede vascular vai culminar na disfunção endotelial, que está presente na patogênese várias complicações como a aterosclerose e a doença cardiovascular (Sena *et al.*, 2013).

1.2 Endotélio

Os vasos sanguíneos são constituídos por três camadas: túnica íntima (células endoteliais), túnica média (células vasculares do músculo liso) e túnica externa ou adventícia (fibroblastos, colagénio entre outros) (Zhao *et al.*, 2015).

O endotélio vascular é uma monocamada de células que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. Durante muitos anos foi considerado apenas como uma barreira inerte que separa duas regiões distintas: o lúmen (onde circula o sangue) e os restantes tecidos corporais. No entanto, tornou-se evidente que este é um órgão ativo a nível parácrino, endócrino e autócrino, desempenhando funções fisiológicas fundamentais para o organismo e interagindo através de mediadores químicos com vários tipos celulares como plaquetas, leucócitos e células musculares lisas.

O endotélio vascular está envolvido em inúmeras funções como a regulação da integridade dos vasos sanguíneos, o crescimento e remodelação vascular, a resposta imunitária, a permeabilidade vascular, a regulação do tónus vascular, o controlo do fluxo sanguíneo e da resposta inflamatória entre outros (Sena *et al.*, 2013).

Esta monocamada de células produz substâncias vasoativas entre as quais: fatores vasodilatadores e anti-proliferativos como o fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI₂) e NO. Pelo contrário, outros fatores produzidos pelo endotélio como a endotelina-1 (ET-1), angiotensina II e as ROS exercem um efeito vasoconstritor. Além destas substâncias, esta camada de células produz também moléculas pró-trombóticas (fator de von Willebrand e o inibidor do ativador do plasminogénio-1 (PAI-1)), o NO e a PGI₂ além da sua função vasodilatadora atuam também como moléculas anti trombóticas. Em suma, o endotélio é essencial para a manutenção da homeostase vascular pois promove o equilíbrio entre vasoconstrição e vasodilatação, inibe e promove a proliferação e a migração das células do músculo liso vascular e previne ou estimula a agregação e adesão das plaquetas. Qualquer disfunção nesta camada leva ao desequilíbrio destas funções culminando na disfunção endotelial (Escandon and Cipolla, 2001).

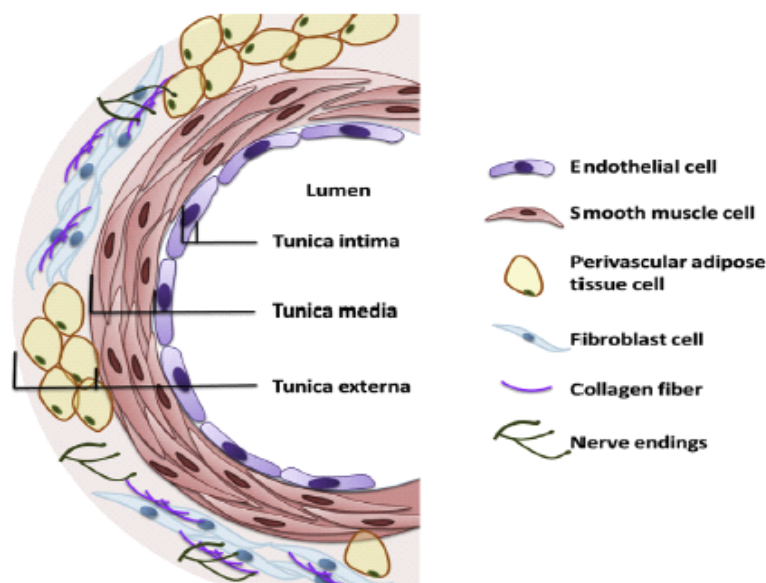


Figura 3: Constituição da parede arterial. Esta é composta pela túnica íntima (endotélio), túnica média (células do músculo liso) e túnica externa (fibras de colágeno, terminações nervosas, fibroblastos e tecido adiposo perivascular). (Adaptado de (Zhao *et al.*, 2015))

1.2.1 Produção de Óxido Nítrico

O NO é o composto vasodilatador mais potente produzido pelas células endoteliais. Este é produzido através da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, reação catalizada pela enzima NO-sintase. Esta enzima tem várias isoformas que incluem a neuronal (nNOS), a indutível (iNOS) e a endotelial ou tipo III (eNOS) (Tsutsui *et al.*, 2015).

A eNOS é a isoforma responsável pela regulação da função vascular, e a sua atividade depende de vários co-fatores como a tetrahydrobiopterina (BH4), o dinucleótido de adenina flavina, a calmodulina e o mononucleótido de flavina (Zhao *et al.*, 2015). Esta enzima na sua forma inativa encontra-se ligada à proteína caveolar, caveolina-I. Com a elevação dos níveis de cálcio citoplasmáticos, a calmodulina liga-se à eNOS o que quebra a ligação com a caveolina-I e promove a ativação da enzima (Sena *et al.*, 2013).

A atividade da eNOS pode ser regulada por modificações pós-translacionais, estas consoante o local que sofre fosforilação podem aumentar ou diminuir a atividade da enzima por exemplo, as modificações que resultam da fosforilação da Ser 1177 aumentam a atividade enzimática. A fosforilação deste local pode ser efetuada por várias cinases como a proteína cinase A, a proteína cinase C e a serina/treonina cinase AKT/PKB (Dudzinski and Michel, 2007).

I. Introdução

Contrariamente, a atividade da eNOS diminui através da atividade de proteínas como a caveolina-1, que é o principal constituinte das vesículas encontradas ao longo do endotélio (caveolas).

A ação da eNOS, que irá culminar na produção de NO, pode ser aumentada ou iniciada por vários estímulos, incluindo estímulos mecânicos (tensão provocada pela corrente sanguínea), ativação de recetores (acetilcolina) ou estímulos independentes de recetores (ionóforos de cálcio) (Zhao *et al.*, 2015).

A acetilcolina (ach) atua através de recetores específicos na membrana das células endoteliais aumentando a concentração de cálcio intracelular, este liga-se à calmodulina e leva à ativação dos domínios de ligação da calmodulina da eNOS (Zhao *et al.*, 2015).

Ao nível muscular, o NO produzido no endotélio difunde-se para as células do músculo liso vascular, nestas ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) que conduz ao aumento do monofosfato de guanidina cíclico (cGMP) o que induz vasodilatação.

Considerando a regulação do lúmen, o NO é uma das mais importantes moléculas produzidas pelas células endoteliais para a manutenção da homeostase vascular. Para além desta função, apresenta também efeito anti-trombótico (inibe a adesão das plaquetas ao endotélio vascular), efeito anti-inflamatório (impede a adesão dos leucócitos ao endotélio dos vasos) e efeito anti-proliferativo (inibe a hiperplasia do músculo liso).

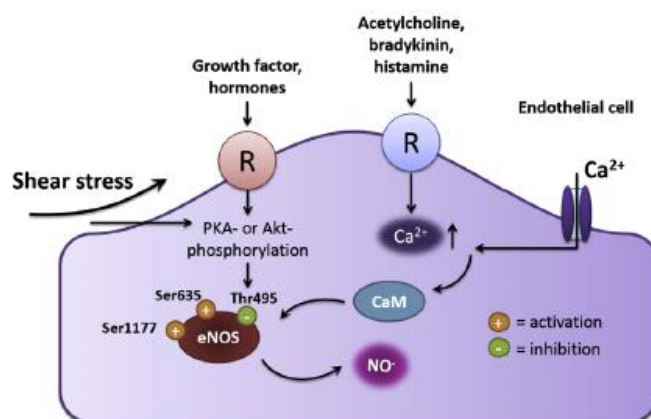


Figura 4: A enzima (eNOS) responsável pela síntese de óxido nítrico (NO) nas células endoteliais pode ser ativada de forma dependente ou independente do cálcio (Adaptado de (Zhao *et al.*,2015)).

1.2.2 Disfunção endotelial

A disfunção endotelial caracteriza-se pela incapacidade do endotélio para manter a homeostase vascular.

Neste estado disfuncional o endotélio perde as suas propriedades fisiológicas e sofre alterações que promovem a vasoconstrição, a adesão de leucócitos, a ativação das plaquetas, a pró-oxidação, o desequilíbrio na coagulação, a inflamação vascular, a aterosclerose e a trombose (Kubisz *et al.*, 2015).

O principal marcador da disfunção endotelial é a redução da biodisponibilidade de NO que é devida a complicações que decorrem ao nível da enzima que sintetiza NO no endotélio: eNOS.

Na presença de concentrações sub-óptimas de substratos ou co-fatores como o BH4, esta enzima torna-se desacoplada levando à formação de ROS em vez de NO. A redução da biodisponibilidade do NO pode dever-se também à degradação acelerada do NO devido às ROS, uma vez que estas reagem com o NO formando produtos como o peroxinitrito o que provoca o aumento de *stress* oxidativo (Zhao *et al.*, 2015).

Este desequilíbrio da função endotelial vai despoletar o desenvolvimento de várias complicações vasculares associadas a patologias como a diabetes *mellitus* tipo 2.

1.2.3 Mecanismos associados à disfunção endotelial e Diabetes *mellitus* tipo 2

A disfunção endotelial é uma característica presente em várias patologias entre as quais a diabetes *mellitus* tipo 2, sendo esta disfunção um fator determinante para o desenvolvimento de complicações vasculares associadas a esta patologia. Fatores presentes na diabetes *mellitus* tipo 2 como a hiperglicemia, o *stress* oxidativo, a resistência à insulina e os ácidos gordos livres são determinantes para o desenvolvimento de disfunção endotelial (Kolluru *et al.*, 2012).

1.2.3.1 Hiperglicemia

Uma das principais características presentes na diabetes *mellitus* tipo 2 é a elevada concentração de glicose no sangue (hiperglicemia crónica). Esta é responsável pela maioria das complicações vasculares associadas à diabetes. A hiperglicemia causa danos nos tecidos devido ao aumento da atividade de várias vias metabólicas como o aumento do fluxo de glucose e outros açúcares através da via dos polióis, a persistente e excessiva

I. Introdução

ativação de várias isoformas da PKC, o aumento da expressão de moléculas de adesão (ICAM (molécula de adesão intracelular), VCAM (molécula de adesão das células vasculares) e E-seletina) e o aumento da atividade da via das hexosaminas (Giacco and Brownlee, 2010).

Um fator determinante na promoção de danos vasculares causados pela hiperglicemia é a formação e acumulação de AGEs bem como o aumento da expressão dos seus receptores (RAGE). Os AGEs formam-se através de glicação não enzimática em que açúcares redutores como a glicose reagem com o grupo amina das proteínas e outras macromoléculas (Vlassara and Uribarri, 2014). Esta reação altera as propriedades físicas e químicas das moléculas, comprometendo a sua função biológica.

A exposição prolongada a estes produtos altera a estrutura e integridade da vasculatura pois os AGEs provocam alterações diretas na estrutura e função de proteínas, além disto podem encontrar-se também na matriz extracelular, modificando a sua estrutura e prejudicando a interação celular. As proteínas intracelulares sofrem também alterações na sua função devido à ação destes produtos. Além desta interação direta, os AGEs provocam dano também pela ligação ao seu receptor RAGE, o que induz a formação de ROS e promove a inflamação mediada por macrófagos (Nowotny *et al.*, 2015).

Os níveis elevados de glicose no sangue associados à diabetes *mellitus* tipo 2 causam a ativação de uma série de mecanismos acima descritos que promovem disfunção endotelial, no entanto, todos estes mecanismos estão interligados pela elevada produção de ROS (Giacco, Brownlee, 2010).

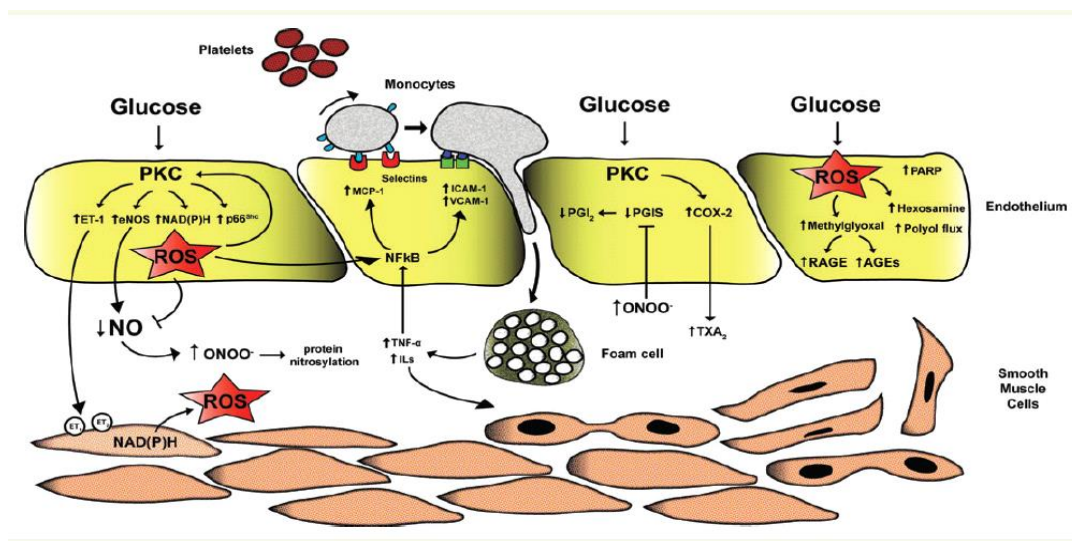


Figura 5: Mecanismos pelos quais a hiperglicemia induz danos vasculares (Adaptado de (Paneni *et al.*, 2013))

1.2.3.2 Stress oxidativo

As espécies reativas de oxigênio são moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados tendo assim um alto grau de reatividade. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxilo (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são as ROS mais representativas presentes no organismo (Tangvarasittichai, 2015).

A formação de ROS resulta inevitavelmente do metabolismo do oxigênio. As maiores fontes de ROS nas células endoteliais são os complexos enzimáticos mitocondriais, a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, as NADPH oxidases, a eNOS desacoplada, a xantina oxidase e o citocromo P450 (Hassanabad, 2010).

Em condições fisiológicas há equilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos de defesa antioxidantes presente no organismo, mantendo-se assim a homeostase. Em caso de patologia, como na diabetes *mellitus* tipo 2 está presente uma grande quantidade de ROS, e também uma redução das defesas antioxidantes presente no organismo conduzindo assim a um estado de *stress oxidativo*, que leva à disrupção e dano celular (Kolluru *et al.*, 2011).

O aumento do *stress oxidativo* na vasculatura é um importante fator que contribui para a disfunção endotelial na diabetes. Uma das principais fontes de ROS na vasculatura são as NADPH oxidases (Nox), estas constituem uma classe de enzimas transmembranares com múltiplas subunidades que catalizam a produção de $O_2^{\cdot-}$ através da redução de O_2 usando o NADPH ou o NADH como dador de elétrons. Estas enzimas apresentam sete homólogos catalíticos, estando quatro deles (Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5) presentes na vasculatura. Em condições patológicas como na diabetes *mellitus* tipo 2, a atividade destas enzimas está aumentada, levando conseqüentemente à maior produção de ROS (Lassègue and Griendling, 2010).

A eNOS desacoplada é também outra fonte importante de ROS na vasculatura dos diabéticos, uma vez que os níveis de um dos co-fatores (BH4), essenciais para o funcionamento da enzima, estão reduzidos. Assim, esta produz superóxido em vez de NO, contribuindo para a promoção de *stress oxidativo* (Potenza *et al.*, 2009).

As mitocôndrias são o principal local de produção de ROS ao nível celular. O mecanismo central responsável pela produção de ROS é a cadeia respiratória mitocondrial durante o processo de fosforilação oxidativa. Esta cadeia localiza-se na membrana mitocondrial interna e é fundamental para a geração de energia celular. No entanto, a respiração ao nível da mitocôndria implica a contínua formação de ROS o que

consequentemente induz stress oxidativo.

A produção de ROS neste organelo é contínua e resulta da auto-oxidação de componentes da cadeia respiratória o que culmina na produção de superóxido e peróxido de hidrogénio. As mitocôndrias são o principal local de produção de ROS, logo como consequência são também o seu principal alvo. As ROS induzem danos ao nível da cadeia respiratória o que, por sua vez, gera mais ROS, gera-se assim um ciclo de dano/formação de ROS, que pode ser o responsável por diversos mecanismos de dano celular (Murphy, 2009).

1.2.3.' Ácidos gordos livres (FFAS)

A disfunção endotelial, a resistência à insulina e os níveis de ácidos gordos livres são fatores estreitamente correlacionados. Uma vez que a disfunção endotelial é consequência de níveis elevados de FFAS e é uma constante em estados de resistência à insulina.

Os tecidos (músculo, fígado e endotélio) de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 estão expostos de forma constante, a níveis elevados de FFAS. Estes interferem na via de sinalização da insulina (PI3K), através de mecanismos que envolvem *stress oxidativo*, fatores pró-inflamatórios o que despoleta insulino- resistência hepática e muscular (Bays *et al.*, 2004).

Supõe-se que os FFAS provocam disfunção endotelial pois prejudicam a via de sinalização da insulina ao nível vascular, assim esta deixa de estimular a enzima eNOS e consequentemente a produção de NO é inibida (Li *et al.*, 2011).

Os FFAS estimulam a atividade da PKC que fosforila diretamente os resíduos de serina (ser307) do recetor da insulina (IR-1) e dos seus substratos (IRS), o que inibe a atividade dos IRS associados à via, culminando em insulino resistência endotelial (Gao *et al.*, 2004).

Para além destes fatores, a ativação de vias pró-inflamatórias é também um fator determinante no desequilíbrio/inibição da vasodilatação dependente do endotélio devido aos FFAS. No entanto, os mecanismos pelos quais os FFAS provocam disfunção endotelial ainda não estão bem elucidados.

I.3 Cirurgia Bariátrica

A percepção de que a diabetes *mellitus* tipo 2 é uma doença crónica e progressiva, de difícil controlo, leva à necessidade de novas abordagens terapêuticas, de entre as quais se insere a cirurgia bariátrica. Este tipo de cirurgia embora inicialmente criada com o objetivo de redução do peso corporal na população com um grau severo de obesidade, adquiriu ao longo do tempo outro potencial, a nível endócrino, relacionado com a remissão da diabetes *mellitus* tipo 2 podendo ser, por isso, designada de cirurgia metabólica (Brethauer *et al.*, 2013).

I.3.1 Tipos de cirurgia

A cirurgia bariátrica pode dividir-se em três tipos distintos com base no mecanismo proposto para a perda de peso, sendo assim existem os procedimentos restritivos, em que o volume do estômago é reduzido, o que conseqüentemente provoca saciedade precoce e redução do consumo de alimentos, como por exemplo, a gastrectomia vertical ou *sleeve*.

Os procedimentos mal-absortivos que englobam a diminuição do tamanho do comprimento do intestino delgado, o que diminui a absorção de nutrientes, como por exemplo a duodeno ileostomia.

Por último, os procedimentos mistos que conjugam os dois anteriores (Ashrafian *et al.*, 2008).

I.3.2 Cirurgia bariátrica na obesidade

O objetivo inicial deste tipo de cirurgia era apenas a perda de peso em pacientes com obesidade mórbida ($BMI > 40 \text{ Kg/m}^2$ ou $BMI > 35 \text{ Kg/m}^2$ associado a comorbidades) nos quais o tratamento tradicional como dieta e exercício físico falhou. No entanto, nestes casos verificou-se não só a perda de peso após a realização da cirurgia mas também a remissão da diabetes *mellitus* tipo 2 e da morbilidade e mortalidade associadas à obesidade e a esta patologia (Stich *et al.*, 2015).

A remissão da diabetes define-se como a melhoria dos níveis sanguíneos de glicose em jejum ($< 100 \text{ mg/dL}$) e de hemoglobina glicada (HbA1c) ($< 6.5\%$) isto após num período de pelo menos um ano sem terapia farmacológica. A este nível a cirurgia

bariátrica é sem dúvida mais eficaz que as terapias convencionais, mostrando resultados promissores a longo prazo em pacientes com obesidade mórbida. Tendo isto em conta, verificou-se que este tipo de cirurgia é também eficaz na remissão da diabetes em pacientes com BMI mais baixo (21-29 Kg/m²) (Mingrone *et al.*, 2012; Stich *et al.*, 2015).

A remissão da diabetes *mellitus* tipo 2 e a melhoria nas morbidades verifica-se num curto período logo após a realização da cirurgia, o que permite inferir que estes acontecimentos são independentes da perda de peso uma vez que esta ainda não ocorreu. Devido a isto, surgem várias teorias como o papel das hormonas intestinais e do eixo entero-insular. Os mecanismos patofisiológicos pelos quais estes resultados são obtidos ainda não estão elucidados, no entanto, sugere-se o papel da restrição calórica, a perda de peso e a mudança das hormonas no eixo enteroinsular (Ashrafian *et al.*, 2008; Sjöström *et al.*, 2004).

I.3.3 Incretinas

As incretinas são hormonas provenientes das células enteroendócrinas da mucosa gastrointestinal, são secretadas após uma refeição e desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase de energia e do metabolismo da glicose. Atuam na regulação da saciedade através das vias neuroendócrinas, controlam o esvaziamento gástrico e estimulam a libertação pós-prandial de insulina pelas células beta pancreáticas. Em condições de patologia como diabetes *mellitus* tipo 2 o perfil destes péptidos encontra-se alterado.

No estômago há a secreção de grelina, um péptido orexigénico que para além da sua ação ao nível do hipotálamo em recetores próprios estimulando o aumento do apetite, regula a homeostase da glicose através do aumento do esvaziamento gástrico e da inibição da secreção de insulina estimulada pela glicose. Os níveis de grelina são inversamente proporcionais ao peso corporal e são primariamente regulados pela ingestão de alimentos.

No entanto, a sua concentração está reduzida em diferentes condições patofisiológicas como a obesidade, a diabetes *mellitus* tipo 2 e outros distúrbios metabólicos (Kojima and Kangawa, 2005).

O peptídeo tirosina-tirosina (PYY), é segregado pelas células endócrinas L no trato gastrointestinal distal, especialmente íleo e cólon, após uma refeição. Comunica com o cérebro, tendo a função de reduzir o apetite. Além disso, este péptideo diminui a

motilidade intestinal e aumenta a absorção de água e eletrólitos no intestino grosso.

O PYY é libertado proporcionalmente à quantidade de calorias ingeridas. Esta substância sinaliza a ingestão alimentar para o centro de apetite do hipotálamo, reduzindo o apetite. Assim, promove a saciedade após a alimentação.

Com a infusão do PYY foi detetada a diminuição dos níveis de grelina. Desta forma, com a inibição do efeito da grelina, mesmo em jejum, quando esta hormona se encontra elevada, ocorre uma maior inibição da ingestão alimentar. Não parece ter qualquer efeito estimulante significativo na secreção pancreática de insulina e glucagina (Batterham *et al.*, 2003).

A incretina semelhante ao glucagon (GLP-1) e o peptídeo inibidor gástrico (GIP) são incretinas segregadas, respetivamente, pelas células L do íleo e pelas células K duodenais, e em conjunto são responsáveis por cerca de 50% da secreção pós-prandial de insulina. Estas incretinas são secretadas durante uma refeição e circulam no sangue durante um curto período de tempo, devido à sua rápida inativação por enzimas. O GLP-1 atua em recetores localizados nas células beta pancreáticas causando a secreção de insulina, para além disto, atua também em recetores no sistema nervoso central e periférico, levando à inibição da secreção de ácidos gástricos, retarda o esvaziamento gástrico, atrasa a absorção dos alimentos, induz saciedade e reduz o apetite (Bo Xu *et al.*, 2015). Em relação ao GIP, o seu principal papel consiste na estimulação das células beta para a secreção de insulina, tendo também influência na indução da proliferação das células beta e inibição da sua apoptose. Vários estudos evidenciam uma redução do efeito das incretinas nos indivíduos que sofrem de diabetes *mellitus* tipo 2, não só devido a uma diminuição dos valores séricos de GLP-1, mas também devido a uma resistência à ação do GIP (Nauck *et al.*, 2004).

O efeito das incretinas é responsável pelo aumento da secreção de insulina após a ingestão de nutrientes, o GLP-1 e o GIP são responsáveis por 60% da secreção pós-prandial de insulina, levando à rápida redução da glucose no sangue.

As ações metabólicas do GLP-1 são mediadas pela ativação do seu recetor e pela estimulação do cAMP e várias vias cinases, incluindo a ERK1/2, PI3K e a PKA. Isto resulta na clivagem de dois aminoácidos a partir da forma nativa do GLP-1 para produzir GLP-1 que atua como um fraco antagonista do recetor de GLP-1 com fraca atividade insulínica.

I.3.4 Cirurgia bariátrica: gastrectomia vertical

Neste tipo de cirurgia, 80% do estômago é removido ao longo da curvatura maior, no entanto, a anatomia intestinal não sofre qualquer modificação. Após este procedimento, ocorre a redução de 25 a 33% do peso corporal e a remissão da diabetes *mellitus* tipo 2 verifica-se em 30 a 40% dos casos (Lho *et al.*, 2015). Esta tornou-se uma cirurgia de eleição devido aos seus efeitos na perda de peso, às mínimas alterações no trato gastrointestinal e sobretudo devido à redução dos riscos cirúrgicos e às poucas complicações pós-operatórias verificadas em casos de diabetes *mellitus* tipo 2 obesos e não obesos (Bo Xu *et al.*, 2015).

A gastrectomia vertical era inicialmente considerada uma mera cirurgia de restrição que antecedia procedimentos mais complexos como o *bypass* duodeno jejuno. No entanto, verificou-se que, por si só, é uma cirurgia menos complexa e causa melhorias significativas na homeostase da glucose em casos de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 (Lee *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais este tipo de cirurgia leva à remissão da diabetes *mellitus* tipo 2 não são ainda bem conhecidos, contudo o papel das hormonas gastrointestinais e a restrição calórica associada ao procedimento podem ser fatores determinantes (Abbatini *et al.*, 2010).

A melhoria na glicemia que se verifica após a gastrectomia vertical não é apenas consequência da perda de peso, uma vez que esta ocorre pouco tempo após a cirurgia quando ainda não se verificou perda de peso significativa. Na diabetes a função das células beta pancreáticas está aumentada para tentar compensar a insulino resistência, no entanto, a dada altura este mecanismo compensatório falha e a doença progride. Nesta fase, recorrendo à cirurgia bariátrica é ainda possível diminuir a insulino resistência, o que vai promover a redução da secreção de insulina e restabelecer a homeostase do organismo (Hans Eickhoff *et al.*, 2014).

A gastrectomia vertical parece ser bastante promissora ao nível da sobrevivência e regeneração das células beta pancreáticas, pois verifica-se que após este procedimento a massa destas células aumenta. O mecanismo que provoca este fenómeno não está ainda elucidado, no entanto, pode dever-se à melhoria do controlo glicémico que reduz a apoptose promovida pela hiperglicemia, ao aumento de hormonas que promovem a expansão destas células como o GLP-I e a supressão da grelina que facilita a libertação de insulina induzida pela glucose, reduzindo a pressão hiperglicémica no pâncreas (Eivind

Grong *et al.*, 2016).

Uma outra hipótese para explicar os benefícios causados por este tipo de cirurgia são alterações no metabolismo, especificamente no metabolismo da glicose. Após a cirurgia, verifica-se que há diminuição da gliconeogénese e da síntese de ácidos gordos livres ao nível hepático, isto porque a concentração de intermediários gliconeogénicos (piruvato e malato) está reduzida, logo pode inferir-se que a gastrectomia vertical suprime a gliconeogénese hepática (Lho *et al.*, 2015).

A gastrectomia vertical demonstrou eficácia semelhante a outros procedimentos mais complexos, relativamente às hormonas intestinais como o aumento da expressão de GLP-1, isto em curtos períodos de tempo após a cirurgia (Madsbad and Holst, 2014). Especulam-se vários fatores que podem causar os efeitos benéficos verificados após este procedimento como o aumento de péptidos como o GLP-1, a elevação dos ácidos biliares no plasma, a alteração do microbioma, o rápido aumento da sensibilidade hepática à insulina, o aumento da secreção de insulina após uma refeição e o aumento da taxa de esvaziamento do estômago (Sandoval, 2016). No entanto, permanece ainda por esclarecer, qual ou quais destes fatores têm um papel determinante no efeito deste procedimento cirúrgico, na remissão da diabetes *mellitus* tipo 2.

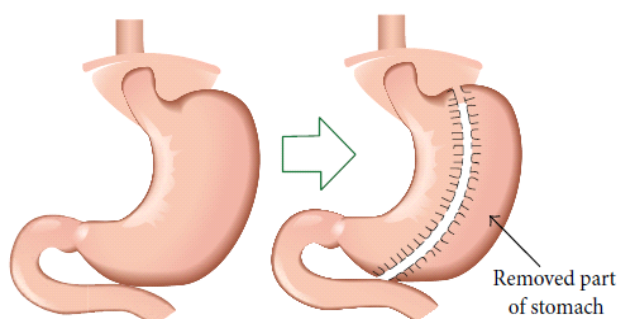


Figura 6: Esquema ilustrativo do procedimento de restrição gastrectomia vertical ou Sleeve (daptado de (Huang *et al.*,2014))

1.3.5 Cirurgia bariátrica: Função endotelial

As incretinas libertadas pelas células endócrinas do intestino para além do seu papel na manutenção da homeostase da glicose, apresentam também um papel vasoativo. O GLP-1 apresenta não só efeitos metabólicos, mas também desempenha funções extra-pancreáticas independentes. Os recetores deste péptido foram originalmente identificados

nas células beta pancreáticas, onde desempenha funções pró-proliferativas e anti apoptóticas (Renner *et al.*, 2016), no entanto estes aparecem também expressos noutros tecidos como os rins, pulmões, células do músculo liso e cardiomiócitos (Ussher *et al.*, 2014). A ativação destes recetores influencia diretamente o sistema cardiovascular ou indiretamente através de ações nos tecidos periféricos (Ussher *et al.*, 2014).

A forma nativa do GLP-I induz vasodilatação dose-dependente em vasos como aortas e mesentéricas, vários mecanismos são especulados para explicar esta ação, tais como a ação de vasorelaxamento ser dependente do NO proveniente do endotélio, mecanismos independentes do endotélio como canais K⁺ dependentes do ATP e cAMP ou a ativação dos β 2 adrenorecetores (Tate *et al.*, 2014).

A sinalização do GLP-I exerce papéis importantes no sistema cardiovascular quer em estados fisiológicos quer em estados patológicos.

O seu efeito vascular é evidente na diabetes *mellitus* tipo 2, onde promove ações benéficas, que é provável que ocorram devido à estimulação da secreção de insulina, que leva ao vasorelaxamento através da ativação da eNOS.

Nesta patologia, como já referido a disfunção endotelial é uma constante, esta é caracterizada pelo aumento de moléculas de adesão em circulação (ICAM-1 e VCAM-1), e pelo aumento da propensão para o desenvolvimento de aterosclerose caracterizada pela infiltração de células inflamatórias e formação de placas, várias evidências sugerem que o GLP-I exerce vários efeitos anti-inflamatórios e anti-aterogénicos, contribuindo assim, de forma positiva para a homeostase vascular (Tate *et al.*, 2014)

O Polipéptido PYY não é apenas um mero regulador do apetite. Ao nível vascular este atua como vasoconstritor e está presente nas placas ateroscleróticas. Os vasos contraídos com o PYY relaxam sob ação da acetilcolina, o que indica que este atua na regulação das células do músculo liso. Em patologias que afetam a biodisponibilidade do NO, como a diabetes e obesidade, este polipeptídeo pode ser responsável pela progressão e agravamento da doença. Apesar da sua ação estar confirmada na aterogénese e vasoconstrição são necessários mais estudos para decifrar a sua função (Smith *et al.*, 2015).

Para além dos seus efeitos clássicos na regulação de energia, a grelina atua também ao nível vascular, apesar de ser produzida no estômago, verificou-se a presença de recetores específicos distribuídos ao nível dos cardiomiócitos e das células endoteliais. Este peptídeo apresenta efeitos anti-oxidantes através da inibição das NADPH oxidases,

I. Introdução

anti-inflamatórios e efeitos de proteção vascular, estes por sua vez estão altamente relacionados com a função endotelial.

A disfunção endotelial, presente em casos de diabetes *mellitus* tipo 2, é revertida pela grelina que induz a produção de NO através da via PI3k. O incremento progressivo de grelina no plasma afeta a homeostase vascular através de mecanismos que envolvem a sensibilidade à insulina e potenciam a vasodilatação (Virdis *et al.*, 2016).

A função endotelial bem como a ação das incretinas está altamente desequilibrada em patologias como a diabetes *mellitus* tipo 2. Sabe-se que a cirurgia bariátrica para além de promover a remissão da diabetes *mellitus* 2 apresenta efeitos positivos na função endotelial, nomeadamente na vasodilatação depende do endotélio, no entanto os mecanismos que promovem estes efeitos não estão ainda bem elucidados.

Inferem-se mecanismos como o papel das citocinas inflamatórias provenientes do tecido adiposo que estabelecem a relação entre tecido adiposo, inflamação e disfunção endotelial, uma vez que estas citocinas libertadas pelo tecido adiposo promovem a produção de superóxido pela NAD(P)H oxidase ou pela cadeia respiratória mitocondrial isto aumenta o *stress* oxidativo e causa disfunção endotelial na macro e microcirculação (Zhang *et al.*, 2011).

A cirurgia promove o decréscimo da adiposidade o que diminui a expressão de citocinas inflamatórias, isto melhora a inflamação e reduz o *stress* oxidativo e como consequência a função endotelial melhora. A cirurgia reverte a disfunção endotelial pelo aumento da biodisponibilidade de NO e pela inibição do *stress* oxidativo vascular (Ashrafian *et al.*, 2008).

I.4 Objetivos

Pretendemos com este trabalho investigar o efeito da cirurgia bariátrica, mais concretamente do procedimento cirúrgico restritivo: a gastrectomia vertical, na disfunção endotelial de modelos animais diabéticos não obesos submetidos a uma dieta rica em gordura, bem como tentar compreender o mecanismo de ação desta cirurgia ao nível vascular.

Serão avaliados os benefícios da gastrectomia vertical em diversos aspetos: variação do peso corporal e ganho de peso, perfil lipídico, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, níveis de *stress* oxidativo e na função da artéria aorta.

É expectável que com a realização da cirurgia a disfunção endotelial regrida e que a diabetes mellitus tipo 2 assuma um perfil remissivo.

2. Material e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Reagentes químicos e imunológicos

Os reagentes usados na preparação das soluções, assim como, os restantes compostos não referenciados na seguinte lista, adquiriram-se às empresas, Sigma-Aldrich, EUA; Merch Darmstad, Alemanha; Panreac Química SA, Espanha, possuindo o mais elevado grau de pureza disponível comercialmente.

Tabela 1: Composição da dieta padrão usada neste trabalho.

Dieta padrão A03 (SAFE, França)			
Kcal/kg	Kcal provenientes de cada constituinte (%)	Quantidade de cada constituinte presente na dieta (%)	
2830			
<u>Proteínas</u>	25.2	<u>Proteínas</u>	21.4
<u>Lípidos</u>	13.5	<u>Lípidos</u>	5.1
<u>Hidratos de carbono</u>	61.5	<u>Hidratos de Carbono</u>	52

Tabela 2: Composição da dieta gorda usada neste trabalho.

Dieta gorda (SAFE, França)			
Kcal/kg	Kcal provenientes de cada constituinte (%)	Quantidade de cada constituinte presente na dieta (%)	
4242.6			
<u>Proteínas</u>	664.9	<u>Proteínas</u>	16.6
<u>Lípidos</u>	39.9	<u>Lípidos</u>	18.8
<u>Hidratos de carbono</u>	1883.9	<u>Hidratos de Carbono</u>	19.0

Tabela 3: Outros produtos usados neste trabalho.

Glicose 30%	Braun, Portugal
Insulina(Humulin Regular 100UI/ml)	Lilly , EUA

2.2 Modelos animais e tratamentos

Neste estudo foi utilizado um modelo animal com diabetes tipo 2 não obeso, ratos Goto Kakizaki (GK) e outro modelo animal normal ratos Wistar com idade correspondente. Estes animais foram obtidos em colónias criadas localmente (Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal). As estirpes foram mantidas em ciclos de dia e noite de 12 horas, a uma temperatura de 22-24°C com humidade de 50-60% e livre acesso a água e alimento durante o estudo.

Para a realização do estudo os machos das duas estirpes com 1 mês de idade foram distribuídos por três grupos: Controlo com dieta normal (WIC); Animais diabéticos com dieta normal (GK) e animais diabéticos alimentados com dieta rica em gordura (GKHFD). A dieta rica em gordura foi devidamente quantificada todas as semanas, para averiguar a quantidade ingerida por cada animal.

Quando os animais (GKHFD) atingiram os 4 meses de idade, foram distribuídos pelos seguintes grupos: animais em que foi realizada a cirurgia bariátrica “Sleeve” (GKHFDSSG) gastrectomia vertical; animais que servem de controlo da cirurgia em que apenas foi feita uma incisão no abdómen e aguardou-se algum tempo para simular procedimentos cirúrgicos mais complexos “Sham” (GKHFDSS) e animais em que não foi realizado qualquer procedimento, controlos (GKHFD).

Dois meses após a realização das cirurgias (6 meses de idade), todos os animais foram sacrificados, para realização de estudos posteriores. Todos os procedimentos nos animais estiveram de acordo com a Lei Portuguesa para a experimentação de animais em laboratório.

2.2.1 Técnicas cirúrgicas

Os animais designados para cirurgia foram operados usando anestesia intramuscular (quetamina 75 mg·kg⁻¹, i.m., ParkeDavis, Ann Arbor, MI, USA) e clorpromazina (2.65 mg·kg⁻¹, i.m., Lab. Vitória, Portugal). As cirurgias foram realizadas de acordo com a distribuição dos animais.

Nos animais designados para a cirurgia placebo (sham), o estômago é mobilizado e é feita uma incisão na parede gástrica anterior. Para simular as técnicas cirúrgicas mais complexas, a incisão gástrica só é fechada após 20 minutos.

Na gastrectomia vertical (*sleeve*) é feita a disseção da maior curvatura incluindo a

parte inferior do estômago com ligação aos vasos gástricos curtos. O estômago é seccionado de forma a moldar a banda gástrica.

Os cuidados pós operatórios incluíram acesso adicional a uma dieta líquida (Forticare®), anti-inflamatório sub-cutâneo (Meloxican 100 µl/Kg) e antibiótico (Baytril 200 µl/Kg) pelo menos 5 dias após a cirurgia.

2.2.2 Peso corporal, glicemia e HbA1c

O peso corporal dos animais foi monitorizado durante o estudo com o objetivo de verificar a sua evolução com a ingestão de dieta gorda.

Aos 4 e 6 meses de idade, foi medida a glicemia e a HbA1c através do sangue recolhido na veia da cauda após jejum de 6 horas. A glicemia foi obtida pelo método da glicose-oxidase, através do glicómetro (Glucometer Elite Bayer, Portugal S.A.) e tiras teste compatíveis (Bayer, Portugal S.A.), os níveis de glicose no sangue total foram expressos em mg/dL.

Os níveis de hemoglobina A1c foram determinados no sangue total utilizando um analisador automático (DCA 2000 Analyser, Bayer, Health Care Diagnostics Division). Os níveis de hemoglobina A1c foram expressos em percentagem.

2.2.3 Teste de tolerância à glicose e Teste de tolerância à insulina

Na mesma idade, 4 e 6 meses de idade, respetivamente foram realizadas provas de tolerância intraperitoneal à glicose (PTIG) e provas de tolerância à insulina (PTII).

Para a prova de tolerância à glicose os animais foram colocados em jejum durante aproximadamente 15 horas, posteriormente injetou-se a glicose intraperitonealmente (1.75 g ·kg⁻¹). Os níveis de glicose foram medidos através do sangue da veia da cauda aos 60 e 120 minutos após a administração através do método da glicose oxidase com o uso de um glicómetro (Glucometer-Elite-Bayer, Portugal S.A.) e tiras de teste compatíveis. Os níveis de glicose foram expressos em mg/dL.

Para a prova de tolerância à insulina os animais foram deixados em jejum durante aproximadamente 6 horas, de seguida injetou-se intraperitonealmente a insulina diluída em soro fisiológico (Humulin Regular 0,25 U/Kg⁻¹). Após a administração a glicose foi medida aos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos através do método da glicose oxidase como descrito anteriormente.

Foi retirado aos 4 e 6 meses sangue através da veia da cauda para tubos com EDTA, estes foram centrifugados a -4°C a 3500 g durante 15 minutos, de seguida foram aliquotados e guardados a -80°C para posteriores estudos de parâmetros sanguíneos.

2.2.4 Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos

A determinação dos níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos foi efetuada através de um analisador automático aos 4 e 6 meses de idade dos animais. A sua concentração foi expressa em mg/dL.

2.2.5 Recolha de sangue

Aos 6 meses de idade, os animais em jejum de 14 a 16 horas foram anestesiados, por via intramuscular com ketamina (5 mg kg⁻¹, i.m., ParkeDavis, Ann Arbor, MI, USA) e o seu sangue total foi retirado por punção cardíaca para avaliação de parâmetros sanguíneos. O sangue foi posteriormente centrifugado a 3500 g a 4°C durante 15 minutos. Por fim, o soro e o plasma foram aliquotados e armazenados a -80°C para posteriores ensaios.

2.2.6 Sacrifício dos animais

Após o procedimento anterior, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após a abertura do abdómen procedeu-se de imediato à recolha da artéria aorta torácica e abdominal preservando o tecido conectivo e adiposo circundante.

A artéria logo após a excisão, foi colocada numa solução de Krebs-Henseleit composta por: (mM): NaCl, 118,6; KCl, 4,7; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 1,18; KH₂PO₄, 1,18; Glicose 11,0; CaCl₂, 1,6, com pH de 7,4 constantemente gaseificada com oxigénio e dióxido de carbono (95% de O₂ e 5% CO₂).

O tecido conjuntivo da aorta abdominal e torácica foi cuidadosamente isolado da aorta e a artéria congelada de imediato em azoto líquido armazenando-se a -80°C para determinações futuras.

A aorta abdominal e torácica foi dividida em vários segmentos, um dos segmentos foi preservado em formol, outro dos segmentos foi colocado numa matriz criopreservante para posteriores estudos histológicos e a restante foi congelada em azoto líquido e de seguida armazenada a -80°C para estudos posteriores.

Por último, segmentos de aorta torácica foram montados nas câmaras do sistema para estudos de tensão isométrica.

2.2.7 Estudos de tensão isométrica

A artéria aorta dividida em pequenos segmentos (4mm) foi montada em câmaras individuais contendo 5 mL da solução Krebs- Henseleit com a composição acima referida (37°C, pH 7.4) oxigenada com 5% O₂, 5% CO₂. Os segmentos foram montados para avaliar as funções do mesmo na resposta das artérias.

Os segmentos de aorta encontram-se ligados a um transdutor de força (sistema PowerLab) dentro das câmaras individuais, que permite visualizar a resposta das artérias aos agonistas utilizados. Inicialmente os segmentos foram sujeitos a uma tensão de repouso de 1.5 g, durante 60 minutos, estabelecida anteriormente como tensão ideal.

Após este período de equilíbrio, as artérias são contraídas com Phe seguindo-se a adição de concentrações crescentes de Ach (de 1 nM a 1 mM), para avaliar a vasodilatação dependente do endotélio.

A solução de Krebs-Henseleit é substituída por uma solução com um inibidor da produção de NO, NωNitro-L-Arginina (L-NAME), após 15 minutos de incubação, esta solução é substituída por uma solução de contração (L-NAME+Phe), ocorre uma nova incubação de 15 minutos e, de seguida, efetua-se uma nova dose resposta resposta à Ach, procedendo como anteriormente.

Posteriormente, a solução é substituída pela solução de Krebs-Henseleit e após o retorno ao equilíbrio (estado basal) é avaliada a resposta a endotelina-1 (ET-1, de 25 nM a 1 μM), um vasoconstritor dependente do endotélio, em intervalos de 10 minutos.

Por último, os segmentos de aorta são colocados como anteriormente no estado basal e é avaliada a resposta de relaxamento independente do endotélio, induzida pelo dador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP; de 1nM a 200 μM)), isto através de concentrações cumulativas.

2.2.8 Níveis de Stress Oxidativo

Para a deteção dos níveis de stress oxidativo na artéria aorta, nomeadamente do radical livre superóxido, usou-se a sonda di-hidroetídio (DHE). Esta é uma sonda lipofílica que permeia com facilidade as membranas e na presença do radical livre superóxido é oxidada a brometo de etídio (produto vermelho fluorescente). A produção de brometo de

etídio é fixada através da intercalação no DNA indicando assim a presença de stress oxidativo.

Utilizaram-se secções de aorta de aproximadamente 10 micrometros de espessura, estas foram incubadas com DHE 2 μ M em PBS durante 30 minutos, a 37°C, em ambiente escuro e húmido. Para a deteção do brometo de etídio, foram obtidas imagens através do microscópio de fluorescência, a 568 nm (Leica DMIRE200, Wetzlar, Alemanha).

2.2.9 Resultados e análise estatística

Os resultados foram todos apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de experiências (n). Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal- Wallis e o teste paramétrico Anova 2 vias, para determinar diferenças significativas entre grupos, para um intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados

3.1 Peso corporal, ingestão de ração, ingestão calórica e níveis de glicose em jejum

Neste estudo os animais foram sujeitos a uma dieta rica em gordura durante 6 meses, pelo que é fundamental avaliar a variação de peso corporal e o perfil de ganho de peso antes e após a realização da cirurgia.

Analisando a variação do peso corporal, pode verificar-se que os animais do grupo controlo (WIC) têm maior peso corporal relativamente aos restantes grupos (Figura 7). O grupo de animais alimentados com dieta gorda durante 6 meses (GKHFD) apresenta maior peso corporal ($p < 0,01$) que o grupo de ratos diabéticos controlo (GK) como seria de esperar devido aos efeitos da dieta (Tabela 4).

Com a realização da cirurgia, o peso do grupo de animais (GKHFD SG) diminuiu significativamente ($p < 0,01$) até às 20 semanas, aumentando depois até às 24 semanas (Figura 7), o que reflete um mecanismo adaptativo pós-cirurgia. Já no grupo GKHFD SS pode observar-se que o peso corporal dos animais aumenta, o que evidencia que a cirurgia placebo não provoca qualquer alteração neste parâmetro.

Relativamente ao ganho de peso, observa-se que não existem diferenças significativas entre os grupos apesar de existirem grupos de animais alimentados com dieta gorda (Figura 8). No entanto, é evidente que a cirurgia induz um menor ganho de peso, sendo este significativamente diferente em relação ao grupo GKHFD, o que demonstra de novo o sucesso da cirurgia na diminuição do peso corporal.

Tendo em conta a administração de uma dieta rica em gordura (hipercalórica), quantificou-se a ingestão de ração e as respetivas calorias. O grupo GKHFD SG apresenta aos 6 meses diferenças significativas relativamente ao controlo ($p < 0,01$) e ao grupo de animais GK ($p < 0,01$) (Tabela 5), o que se deve aos efeitos do procedimento cirúrgico na redução da ingestão de alimentos. No entanto, ao nível calórico não existem diferenças significativas entre grupos.

3. Resultados

Tabela 4: Peso corporal, correspondentes ao período pré-cirúrgico (4 meses) e pós-cirúrgico (6 meses), nos diferentes grupos de animais em estudo. (WIC- ratos Wistar controlo; GK- Ratos Goto-Kakizaki controlo; GKHFD- Ratos Goto-Kakizaki controlo alimentados com uma dieta rica em gordura; GKHFDSSG - Ratos Goto-Kakizaki submetidos à cirurgia “Sleeve” e GKHFDSS- Ratos Goto-Kakizaki “sham”). *** p<0,001 em comparação com o grupo WIC; ** p<0,01 em comparação com o grupo WIC.

	WIC (n=18)	GK (n=24)	GKHFD (n=6)	GKHFDSS (n=3)	GKHFDSSG (n=4)
Peso corporal 4 meses (g)	436±5,10	330±2,98***	339±21,22**	373±18,22	375±9,42**
Peso corporal 5 meses (g)	460 ±6,49	353±2,91***	374±14,87**	389±16,70	335±7,78**
Peso corporal 6 meses (g)	515 ±14,28	362±2,44***	411±13,69**	440±16,14	379±4,97**

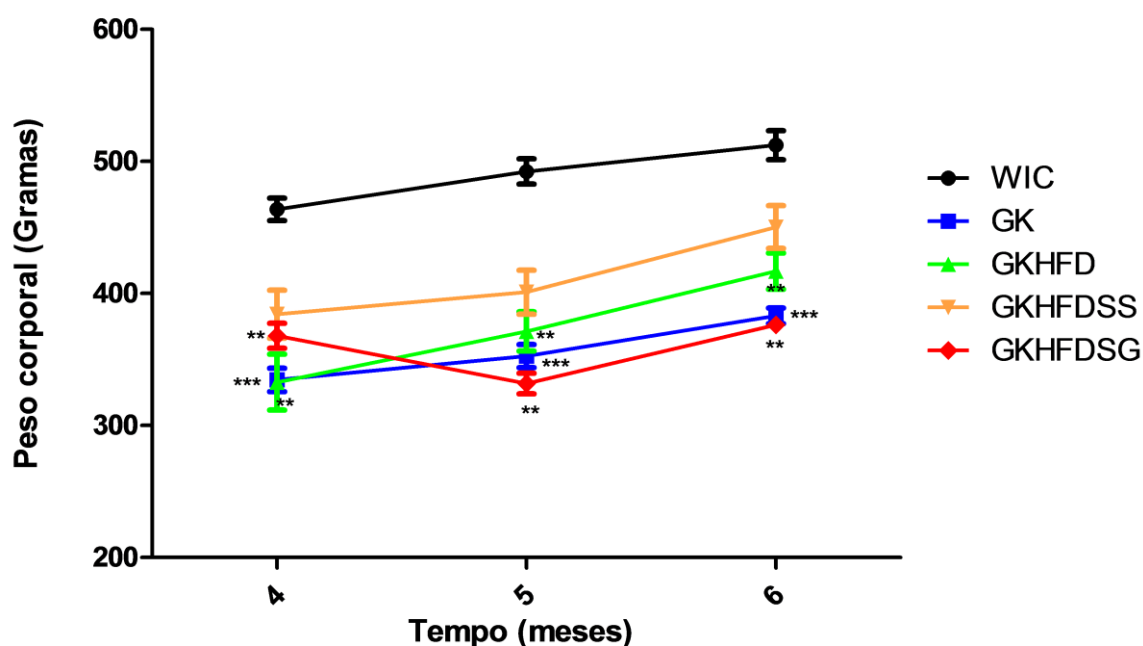


Figura 7: Peso corporal dos animais aos 4, 5 e aos 6 meses de idade. Na figura está representado o efeito da cirurgia e da dieta gorda no peso corporal dos animais diabéticos relativamente aos controlos Wistar (WIC). Os resultados estão apresentados como média ± e.p.m. (n=3-24). *** p<0,001 em comparação com o grupo WIC; ** p<0,01 em comparação com o grupo WIC.

3. Resultados

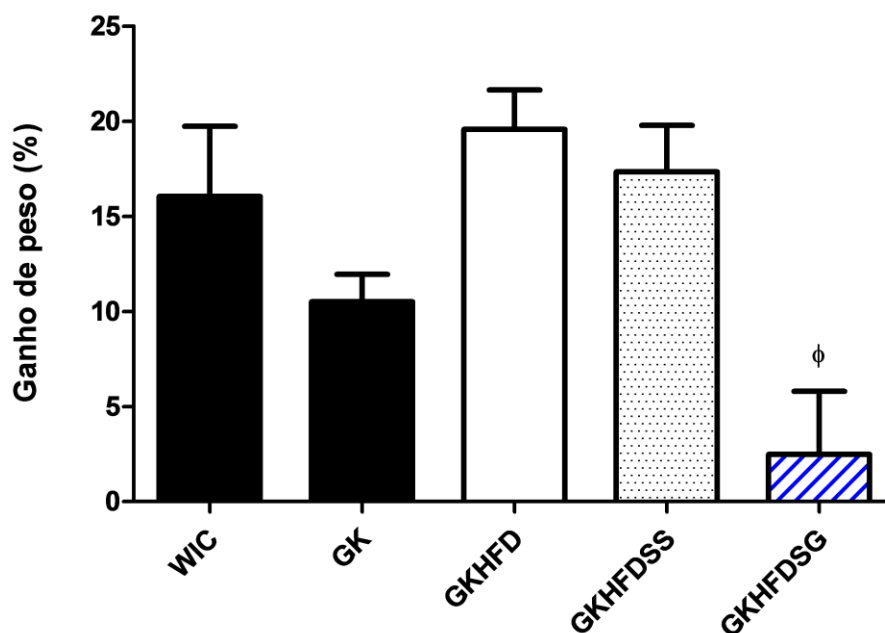


Figura 8: Percentagem de ganho de peso dos animais entre os 4 e 6 meses de idade. Na figura está representado o efeito da cirurgia e da dieta gorda no peso corporal dos animais diabéticos. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=3-24). Φ $p < 0.05$ em comparação com o grupo GKHFD.

Tabela 5: Ingestão calórica e ingestão de ração, correspondentes a 24 semanas, nos diferentes grupos em estudo. (WIC- ratos Wistar controle; GK- Ratos Goto-Kakizaki controle e GKHFD- Ratos Goto-Kakizaki controle alimentados com uma dieta rica em gordura; GKHFDSG - Ratos Goto-Kakizaki “Sleeve” e GKHFDS- Ratos Goto-Kakizaki “sham”). ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo WIC; \$\$\$ $p < 0,01$ em comparação com o grupo GK.

	WIC (n=17)	GK (n=12)	GKHFD (n=6)	GKHFDS (n=3)	GKHFDSG (n=4)
Ingestão de ração 4 meses (g/rato/dia)	23,6 \pm 0,88	26,06 \pm 0,32	19,34 \pm 0,53	19,11 \pm 0,97	19,29 \pm 0,93
Ingestão de ração 6 meses (g/rato/dia)	23,6 \pm 0,88	26,06 \pm 0,32	19,90 \pm 0,32	19,70 \pm 0,40	16,45 \pm 0,28** \$\$\$
Ingestão calórica 4 meses (g/rato/dia)	66,9 \pm 2,49	73,7 \pm 0,92	84,74 \pm 2,82	81,07 \pm 4,14	82,60 \pm 3,97
Ingestão calórica 6 meses (g/rato/dia)	66,9 \pm 2,49	73,7 \pm 0,92	81,88 \pm 2,60	83,57 \pm 2,69	69,79 \pm 1,20

3.2 Perfil lipídico dos animais: Níveis séricos de colesterol total e Triglicerídeos

Devido ao uso de animais submetidos a dieta gorda, é pertinente analisar o seu perfil lipídico.

Relativamente ao colesterol total aos 4 meses, não existem diferenças significativas entre grupos (Tabela 6), embora aos 6 meses a tendência seja para diminuir (Tabela 7), embora sem diferenças significativas, no grupo GKHFDSG devido à cirurgia. Os níveis de triglicerídeos, no grupo GKHFD apresentam como seria expectável, níveis significativamente elevados ($p < 0,01$) em comparação com o grupo controlo e com o grupo GK ($p < 0,05$), no grupo GKHFDSG os níveis de triglicerídeos são mais baixos comparativamente com o grupo controlo ($p < 0,05$) (Tabela 7), isto possivelmente devido à ação benéfica do procedimento cirúrgico realizado nestes animais.

Tabela 6: Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, correspondentes ao período pré- cirúrgico (4 meses), nos diferentes grupos em estudo. (WIC- ratos Wistar controlo; GK- Ratos Goto-Kakizaki controlo; GKHFD- Ratos Goto-Kakizaki alimentados com uma dieta rica em gordura). ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo WIC; \$ $p < 0,05$ em comparação com o grupo GK.

	WIC (n=9)	GK (n=9)	GKHFD (n=6)
Colesterol total (mg/dL)	136±11,31	158±3,13	176±8,06
Triglicerídeos (mg/dL)	155±1,48	149,5±2,21	424±15,05**\$

Tabela 7: Níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos correspondentes ao período pós-cirúrgico (6 meses), nos diferentes grupos em estudo. (WIC- ratos Wistar controlo; GK- Ratos Goto-Kakizaki controlo; GKHFD- Ratos Goto-Kakizaki alimentados com uma dieta rica em gordura, GKHFDSG- Ratos Goto-Kakizaki “Sleeve” e GKHFDS- Ratos Goto-Kakizaki “sham”). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo WIC; \$\$\$ $p < 0,001$ em comparação com o grupo GK; \$ $p < 0,051$ em comparação com o grupo GK.

	WIC (n=9)	GK (n=9)	GKHFD (n=6)	GKHFDSS (n=3)	GKFHFDSG (n=4)
Colesterol total (mg/dL)	168±1,86	156±2,53	177,5±20,68	201±43,94*	171,5±13,27
Triglicerídeos (mg/dL)	166±11,07	118±10,31	463,5±32,94\$\$\$	361±63,10,94\$	274,5±47,57

3.3 Níveis de glicose em jejum

Uma vez que este trabalho tem como objetivo avaliar o impacto da cirurgia bariátrica na diabetes é fundamental analisar os níveis de glicose em jejum uma vez que este é um dos parâmetros cruciais nesta patologia.

Aos 4 meses de idade, ou seja, no período pré-cirúrgico, existem diferenças estatisticamente significativas na glicemia do jejum entre o grupo de animais GK ($p < 0,05$) e o grupo controlo, o que seria de esperar uma vez que se trata de animais diabéticos, logo os níveis de glicose são mais elevados. No grupo GKHFHD verificam-se também diferenças significativas ($p < 0,001$) comparativamente com o controlo, isto devido à disfunção induzida pela dieta gorda (Figura 9A).

Aos 6 meses, apesar de não ser estatisticamente significativa, os animais do grupo GKHFDSG apresentam uma ligeira redução dos níveis de glicose em, isto possivelmente devido à restrição calórica decorrente da cirurgia (Figura 9B).

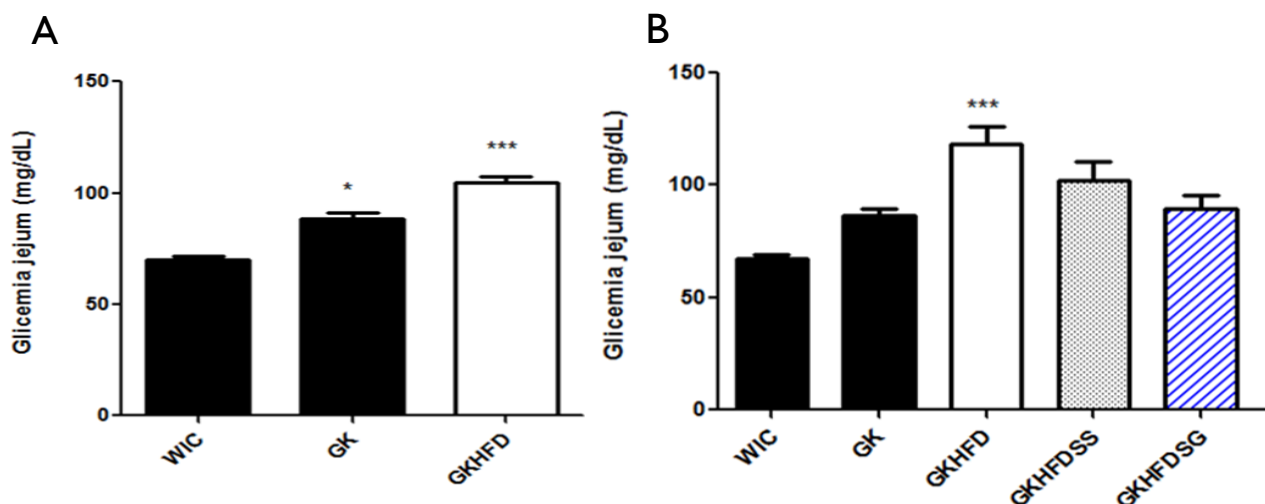


Figura 9: Glicémia dos animais após jejum de 12 horas, antes da cirurgia (4 meses) (painel A) e após a cirurgia (5 e 6 meses) (painel B). Na figura está representado o efeito da cirurgia e da dieta gorda nos níveis de glicose em jejum dos diferentes grupos de animais. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n=3-15$). *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo WIC; * $p < 0,05$ em comparação com o grupo WIC.

3.4 Prova de tolerância à glicose e Prova de tolerância à insulina

A resistência à insulina é uma das características predominantes em casos de Diabetes *mellitus* tipo 2. Como o presente estudo visa avaliar o impacto da cirurgia bariátrica nesta patologia, utilizou-se a prova de tolerância intraperitoneal à glicose (PTG) e à insulina (PTI) como métodos para avaliar a tolerância à glicose e a resistência periférica à insulina dos grupos de animais.

3. Resultados

Analisando a PTG, aos 4 meses, o grupo WIC apresenta os níveis de glicemia mais baixos comparativamente com os outros grupos em estudo (Figura 10A), como seria de esperar uma vez que se trata do grupo controlo não diabético. O grupo de animais GK apresenta uma área debaixo da curva (AUC) maior comparativamente com o controlo ($p < 0,01$) (Figura 10B), o que seria expectável uma vez que se trata de animais diabéticos.

O grupo GKHFD apresenta também uma AUC maior com diferenças significativas relativamente ao controlo ($p < 0,001$) (Figura 10B). Aos 6 meses, verifica-se que a disfunção do grupo GKHFD é maior uma vez que neste caso os animais estão já submetidos à dieta gorda durante mais tempo, este grupo apresenta diferenças significativas em relação ao controlo ($p < 0,001$) (Figura 10C). Nos animais submetidos à cirurgia, pode verificar-se uma ligeira diminuição da AUC (Figura 10D), que embora não seja significativa, já é o indício de um possível efeito positivo da cirurgia na melhoria deste parâmetro.

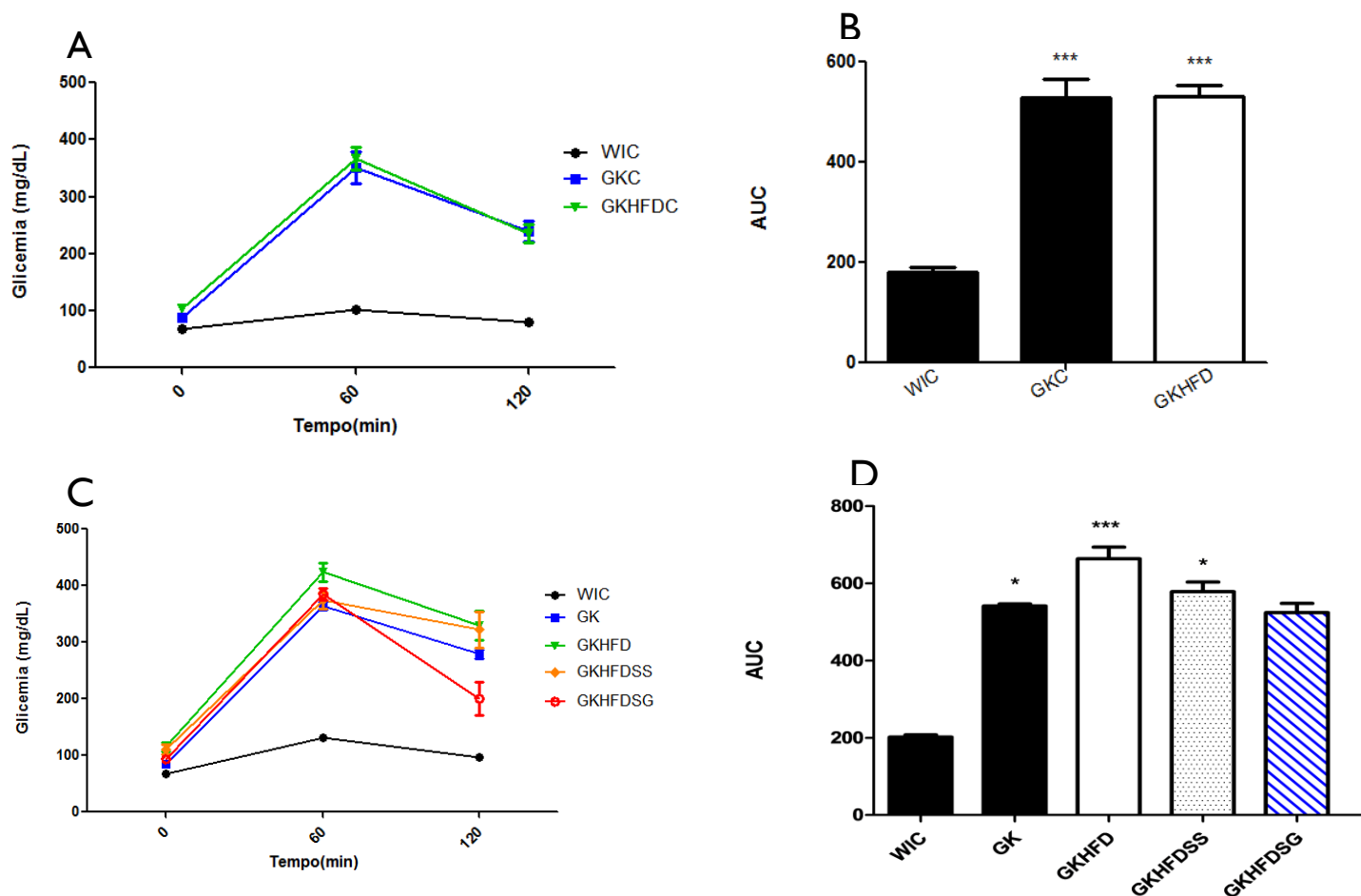


Figura 10: Prova de tolerância intraperitoneal à glicose aos 4 meses de idade dos animais (painel A e B) e aos 6 meses de idade dos animais (painel C e D). Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicose ao longo da prova (120 minutos) e a respetiva área abaixo da curva (AUC). Os resultados estão

3. Resultados

apresentados como média \pm e.p.m. (n=3-15). ***p<0,001 em comparação com o grupo WIC; *p<0,05 em comparação com o grupo GK.

Tendo em conta a PTI, aos 4 meses é já evidente a disfunção provocada pela dieta gorda (Figura 11A), uma vez que o grupo GKHFD tem uma AUC maior que os restantes grupos e existe uma diferença significativa comparativamente com o controlo (p<0,01) (Figura 11B).

Aos 6 meses, no grupo GKHFDSG observa-se uma tendência para a melhoria do perfil glicémico (Figura 11C) e pode observa-se uma diminuição da AUC (Figura 11D), que embora não seja estatisticamente significativa, indica que a cirurgia pode de facto melhorar a sensibilidade à insulina nos animais diabéticos.

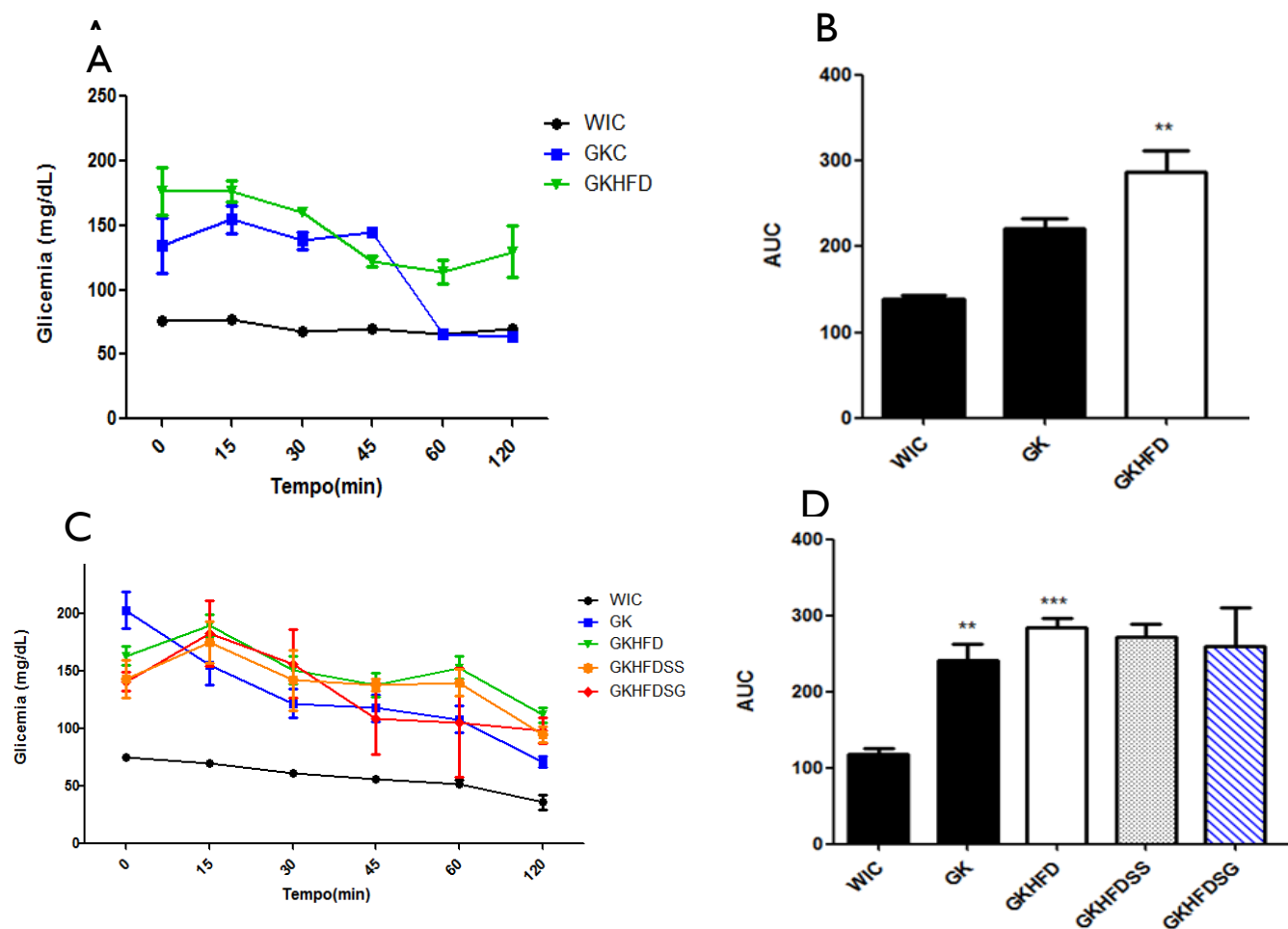


Figura 11: Prova de tolerância intraperitoneal à insulina aos 4 meses (painel A e B) e aos 6 meses de idade (painel C e D) dos animais. Na figura estão representadas a variação dos níveis de glicose ao longo do período da prova (120 minutos) e a respetiva área abaixo da curva (AUC). Os resultados estão apresentados como média e.p.m. (n=3-15).***p<0,001 em comparação com o grupo WIC; **p<0,01 em comparação com o grupo WIC.

3.5 Estudos funcionais

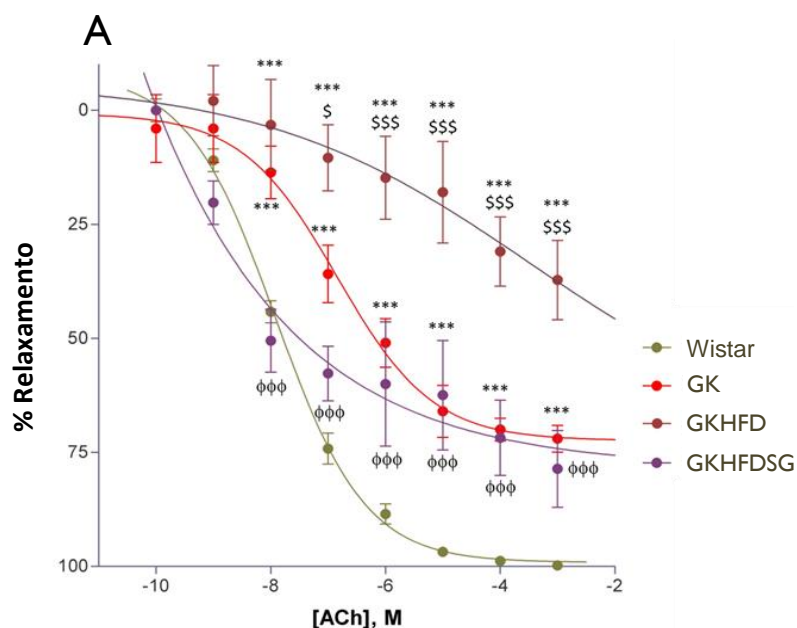
3.5.1 Relaxamento dependente e independente do endotélio

A vasodilatação dependente do endotélio foi analisada através da adição de concentrações crescentes de acetilcolina à artéria aorta que foi pré-contraída com fenilefrina.

Observa-se claramente que o grupo alimentado com dieta gorda (GKHFD) apresenta uma menor vasodilatação, havendo uma diferença significativa relativamente aos controlos ($p < 0,001$) (Figura 12A) bem como uma resposta à acetilcolina muito mais tardia do que os grupos controlo Wistar e GK; o que indica que este tipo de dieta agrava a disfunção vascular nos animais diabéticos.

O grupo GKHFD SG apresenta um nível de relaxamento significativamente diferente, quando comparado com o grupo GKHFD ($p < 0,001$), observando-se que estas artérias relaxam para níveis próximos do grupo GK que não foi alimentado com dieta gorda (Figura 12 A). Estes resultados comprovam claramente o efeito benéfico da cirurgia na melhoria da função endotelial.

Analisando o perfil de relaxamento independente do endotélio na artéria aorta, através dos efeitos do dador de NO (SNP), não há diferenças significativas entre grupos e o relaxamento foi de praticamente 100% (Figura 12B).



3. Resultados

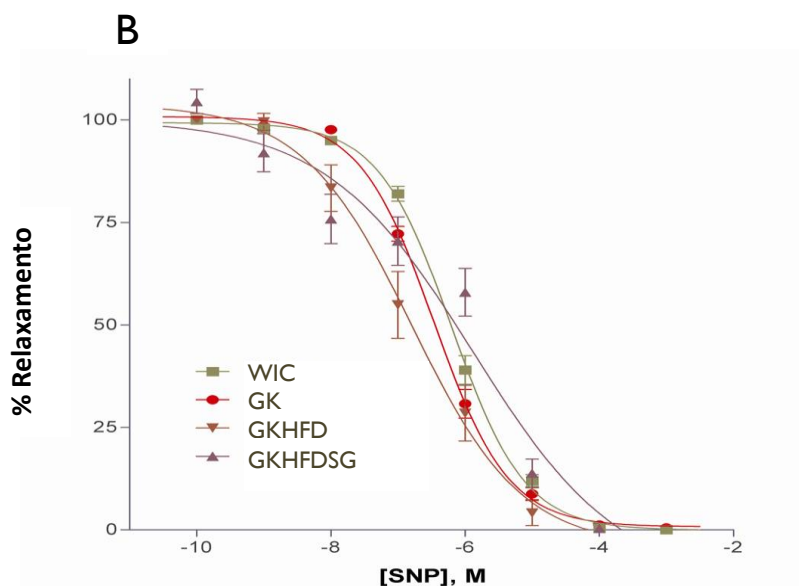


Figura 12: Curvas concentração-efeito com acetilcolina (imagem A) e com nitroprussiato de sódio (imagem B). Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=3-15).***p<0,001 em comparação com o grupo WIC; \$\$\$p<0,001 em relação ao grupo GK; \$p<0,05 em relação ao grupo GK; Φ p<0,001 em relação ao grupo GKHFD.

A incubação dos segmentos de aorta com o inibidor da enzima eNOS (L-NAME), permite avaliar a vasodilatação arterial mediada por outros vasodilatadores (independente da produção de NO). Verifica-se que todos os grupos de animais apresentam diferenças significativas relativamente ao controlo, e ocorre o relaxamento em todos os grupos de animais (mais relevante a concentrações de Ach superiores). Este relaxamento é mais acentuado em todos os grupos de animais alimentados com dieta gorda (GKHFD, GKHFDSG) (Figura 13).

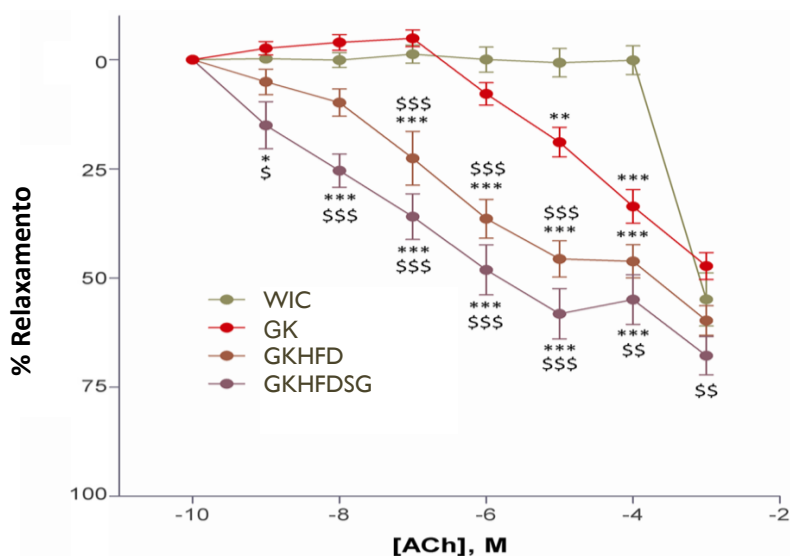


Figura 13: Curvas concentração-efeito com acetilcolina na presença de L-NAME. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=3-15). ***p<0,001 em comparação com o grupo WIC; **p<0,01 em comparação com o grupo WIC; *p<0,05 em comparação com o grupo WIC; \$\$\$p<0,001 em relação ao grupo GK; \$\$\$p<0,01 em relação ao grupo GK; \$p<0,05 em relação ao grupo GK.

3.5.2 Contração em resposta a endotelina-I

Analisou-se a contração das artérias em resposta a concentrações crescentes de endotelina -I. Verifica-se que os animais do grupo controlo (Wistar) apresentam uma maior contração comparativamente com os outros grupos, para concentrações de endotelina acima dos 100 nM. Ao contrário do que seria previsível, os animais diabéticos (GK) têm menor contração (Figura 14).

O grupo GKHFD apresenta uma contração significativamente reduzida em relação aos grupos GK e Wistar controlo, isto possivelmente devido ao efeito vasodilatador promovido pela alimentação com dieta gorda.

Verifica-se que o grupo submetido a cirurgia bariátrica (GKHFD SG), apresenta um perfil semelhante ao GKHFD (Figura 14).

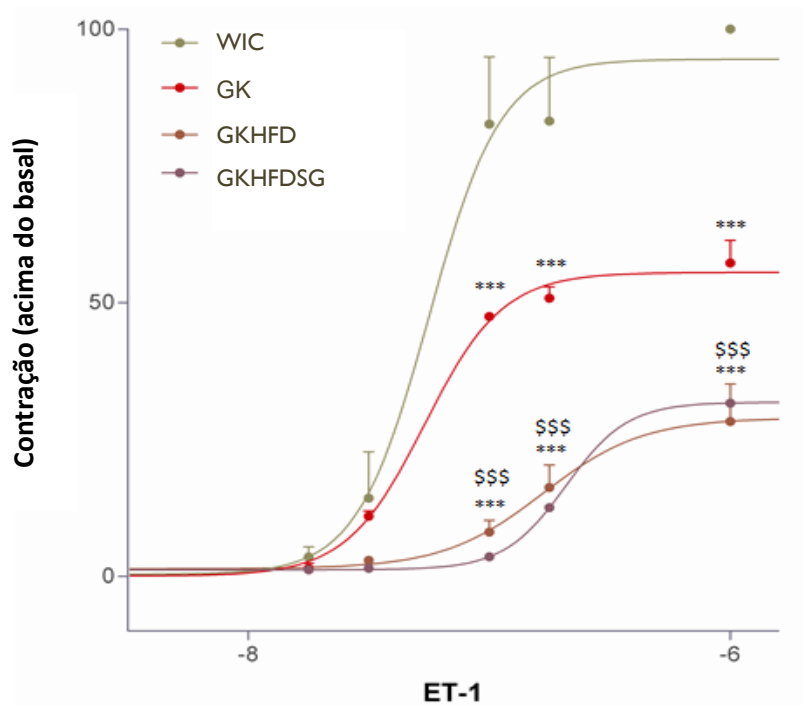


Figura 14: Curvas concentração-efeito em resposta a endotelina-I. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=3-15). ***p<0,001 em comparação com o grupo WIC; \$\$\$p<0,001 em relação ao grupo GK.

3.6 Stress oxidativo na parede vascular: Sonda DHE

Como o anião superóxido é uma das principais ROS a promover a diminuição da biodisponibilidade de NO na diabetes *mellitus* tipo 2, fomos verificar, através de uma técnica de imunofluorescência, se os seus níveis estariam aumentados na artéria aorta dos animais diabéticos alimentados com dieta gorda e se, pelo contrário, os seus níveis diminuiriam com a realização da cirurgia bariátrica.

Pode verificar-se na figura 16 que os níveis de anião superóxido aumentaram no grupo de animais alimentados com dieta gorda (GKHFD), e que esses níveis são estatisticamente significativos em comparação com o grupo controlo ($p < 0,01$).

É evidente a redução deste anião no grupo de animais submetidos à cirurgia, tendo este grupo níveis estatisticamente significativos comparativamente com o grupo de animais diabéticos controlo (GK), (Figura 15 e 16), o que indica que este procedimento atua de forma a diminuir a presença destas espécies reativas na vasculatura.

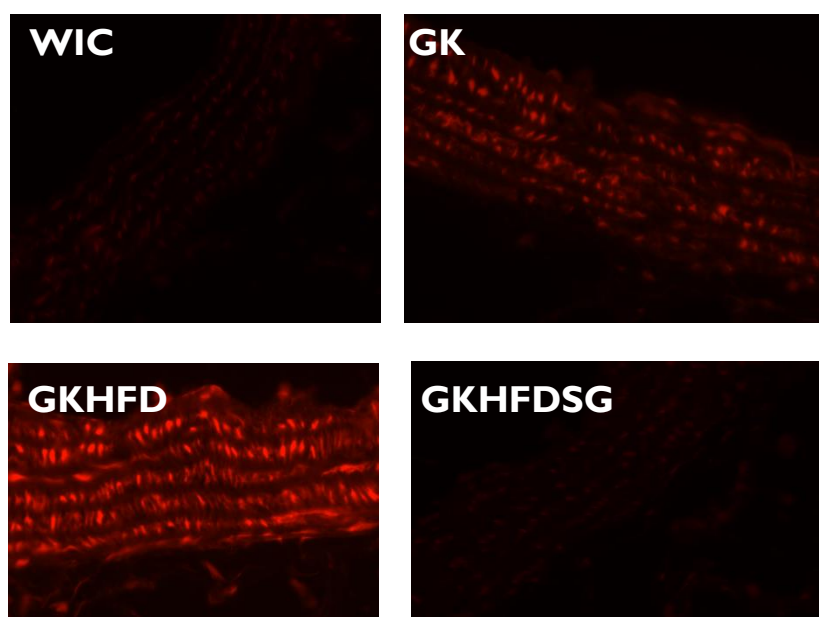


Figura 15: Deteção *in situ* do anião superóxido, através de fluorescência vermelha, após incubação com a sonda DHE. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n=3-15$).

3. Resultados

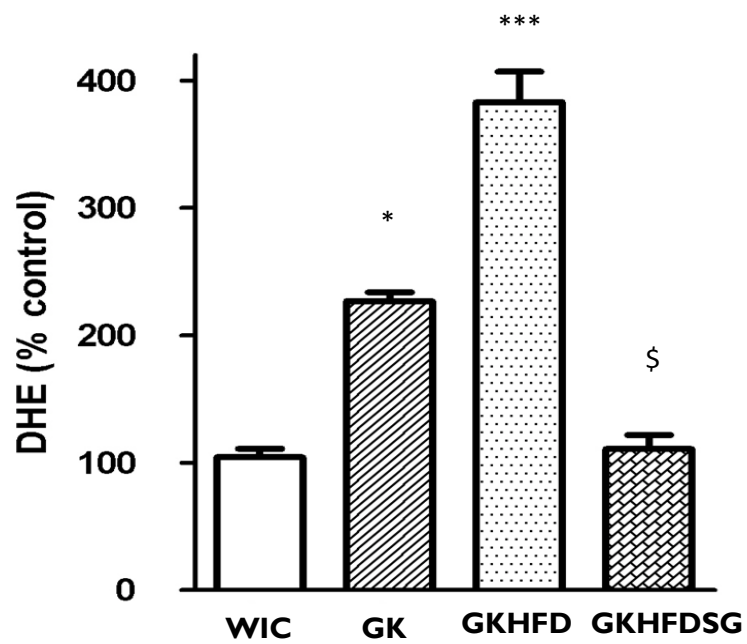


Figura 16: Quantificação da fluorescência obtida pela detecção in situ do anião superóxido através da sonda DHE. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=3-15). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo WIC ; *** $p < 0,01$ em comparação com o grupo WIC; § $p < 0,05$ em comparação com o grupo GK.

4. *Discussão*

4. Discussão

A Diabetes *mellitus* tipo 2 é uma patologia que tem vindo a assumir cada vez maiores proporções sendo atualmente considerada uma epidemia. Com o número de casos a aumentar de forma descontrolada, surgem cada vez mais novas abordagens terapêuticas que visam melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir as suas comorbilidades.

Neste estudo foi avaliada a eficácia terapêutica da cirurgia metabólica na remissão da diabetes *mellitus* tipo 2 em modelos animais diabéticos não obesos alimentados com uma dieta gorda e o seu impacto na disfunção endotelial.

Para isto foram utilizados dois tipos de modelos animais e diferentes dietas. Utilizaram-se ratos normais (Wistar) alimentados com dieta padrão, ratos diabéticos não obesos (Goto-Kakizaki) alimentados com dieta padrão e ratos GK alimentados com uma dieta rica em gordura, com o objetivo de simular os erros alimentares da população atual, incrementar o fenótipo e agravar a disfunção endotelial já existente nos animais diabéticos. Estes animais alimentados com dieta gorda foram submetidos a gastrectomia vertical (ou Sleeve), uma cirurgia metabólica, e foram avaliados os efeitos da mesma nos seus parâmetros corporais (peso, ingestão calórica e de ração), no perfil lipídico (níveis séricos de colesterol total e triglicéridos), na glicemia em jejum, na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina (provas de tolerância à glicose e insulina), bem como ao nível vascular através de estudos de avaliação de relaxamento dependente e independente de endotélio e de contração muscular em resposta a endotelina-I.

Os resultados demonstraram que a cirurgia bariátrica sleeve diminuiu o peso dos animais, e a sua ingestão de ração bem como melhorou os níveis de triglicéridos dos animais, a glicose em jejum e a resistência à insulina, contribuindo também para a melhoria do stress oxidativo e da disfunção endotelial associada.

Analisando os resultados verifica-se que a dieta gorda aumentou significativamente o peso corporal dos animais diabéticos comparativamente com os ratos GK controlo e que este tipo de gastrectomia vertical diminui significativamente o peso corporal, voltando no entanto a aumentar algum tempo após a cirurgia para valores próximos do controlo (GK), o que se pode explicar pela adaptação desenvolvida pelo animal após a cirurgia. Estes resultados estão de acordo com a literatura em que se verifica o mesmo efeito da cirurgia no peso corporal dos animais (Grong *et al.*, 2014; Anyakudo and Omotayo, 2015).

Foi já evidenciado em vários estudos que os animais alimentados com dietas ricas em gordura, além do aumento do peso corporal apresentam alterações ao nível do perfil

lipídico, tais como aumento do colesterol total e dos níveis de triglicerídeos (Eickhoff et al., 2014).

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode inferir-se que estão de acordo com a literatura uma vez que os níveis de triglicerídeos aumentam significativamente com a dieta gorda e diminuem com a realização da cirurgia. No entanto, os níveis de colesterol não apresentam diferenças entre grupos.

Com a realização da cirurgia, verifica-se uma diminuição da glicose em jejum comparativamente com o controlo e com o grupo de animais diabéticos alimentados com dieta gorda. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, isto deve-se ao facto de haver restrição calórica pós-cirúrgica e à ação deste tipo de cirurgia na supressão da gliconeogénese hepática (Lho et al., 2015).

Uma vez que a Diabetes *mellitus* tipo 2 se caracteriza pela insuficiente produção e ação da insulina é conveniente a realização das provas de tolerância à glicose e à insulina. Neste caso os nossos resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que a área abaixo da curva nos animais alimentados com dieta gorda é maior, o que indica maior disfunção causada por este tipo de alimentação (Anyakudo and Omotayo et al., 2015).

Através destes resultados pode também comprovar-se a eficácia da gastrectomia vertical na melhoria da sensibilidade à insulina uma vez que em ambas as provas a AUC deste grupo de animais é menor, o que está de acordo com a literatura (Chambers et al., 2011) e deve-se possivelmente à restrição calórica induzida pela cirurgia, uma vez que é removida a maior parte do estômago, em consequência ocorre um aumento da secreção de incretinas como o GLP-I que promovem a secreção de insulina e ocorre também uma redução da secreção de grelina (Eickhoff et al., 2014).

A disfunção endotelial é uma condição sistémica que se define pelo desequilíbrio na manutenção da homeostase vascular, ou seja, o endotélio produz mais substâncias vasoconstritoras, a biodisponibilidade do NO está reduzida, aumenta a produção de moléculas de adesão e a expressão de citocinas inflamatórias bem como a maior produção de ROS. Esta disfunção está presente em várias patologias como a diabetes *mellitus* tipo 2 e contribui para as complicações macro e microvasculares associadas (Kolluru et al., 2012; Sena et al., 2013).

Como a disfunção endotelial é uma característica da diabetes *mellitus* tipo 2, no nosso trabalho avaliamos o impacto da cirurgia bariátrica ao nível vascular, recorrendo para isso a estudos funcionais utilizando segmentos da artéria aorta.

Tendo em conta os resultados dos estudos funcionais verifica-se que o

relaxamento dependente do endotélio, ou seja, induzido pela Ach, é menor nos animais diabéticos, como seria de esperar, devido à disfunção endotelial associada a estes casos. Este é também menor e mais tardio no grupo de animais GKHFD. Este resultado pode dever-se ao facto da dieta gorda induzir alterações a nível vascular promovendo inflamação e *stress* oxidativo (Sena *et al.*, 2011).

O tecido adiposo perivascular segrega várias substâncias bioativas que podem também influenciar e que regulam o metabolismo dos adipócitos e outros processos celulares como a regulação do tónus do músculo liso vascular (Oriowo *et al.*, 2015). Em condições fisiológicas este liberta fatores anti-contráteis enquanto em condições patológicas como na diabetes *mellitus* tipo 2, há o favorecimento de um ambiente pró-oxidativo, inflamatório e contrátil (Meijer *et al.*, 2011).

Muito possivelmente a dieta rica em gordura usada neste trabalho potencia o desequilíbrio entre os agentes anti e pró-oxidantes e induz uma resposta inflamatória no PVAT o que provoca *stress* oxidativo e agrava a disfunção endotelial. A acumulação de lípidos e o aumento dos adipócitos que é potenciado por este tipo de dietas está relacionado com o aumento de citocinas pró-inflamatórias (MCP-1), este é um fator chave na infiltração de macrófagos neste tipo de tecido adiposo. Estes macrófagos segregam ROS através das NADPH oxidases o que conseqüentemente promove a desregulação das adipocinas e causa danos nas células endoteliais. Em suma, a diabetes *mellitus* por si só está intrinsecamente associada a níveis elevados de *stress* oxidativo e disfunção endotelial, características que são ainda mais agravadas pela dieta rica em gordura (Ketonen *et al.*, 2010; Ortega *et al.*, 2014).

A dieta gorda pode também causar disfunção endotelial através da desregulação da via AMPK/PI3K/AKT/ eNOS. A AMPK atua como uma enzima que regula vários sistemas intracelulares, é expressa nas células endoteliais da vasculatura e nas células do músculo liso vascular. Esta induz o aumento do NO, mediado pela via PI3K /AKT na vasculatura isto através da fosforilação da eNOS no resíduo SER1177, o que promove a produção de NO. A dieta gorda desregula esta via diminuindo assim a produção de NO e potenciando a disfunção endotelial. Isto acontece nas células endoteliais provavelmente devido aos elevados níveis de lípidos no sangue e aos níveis de glicose descontrolados (Prieto *et al.*, 2015).

A cirurgia bariátrica comparativamente com outras terapêuticas, demonstrou os resultados mais eficazes e promissores mesmo a longo prazo, isto relativamente à perda

de peso e à melhoria das co-morbilidades associadas à obesidade como a diabetes *mellitus* tipo 2 (Sjöström *et al.*, 2004).

A gastrectomia vertical é um tipo de cirurgia bariátrica restritivo, uma vez que é removida a maior curvatura do estômago, este procedimento é menos complexo do que os restantes, no entanto, é também eficaz na remissão da diabetes *mellitus* tipo 2. Em casos de obesidade, verifica-se que este tipo de cirurgia promove a perda de peso e para além disto, diminui a gordura corporal e melhora a tolerância à glicose (Chambers *et al.*, 2011).

Devido aos resultados promissores obtidos em obesos, surgiu a opção de avaliar os efeitos deste tipo de cirurgia em casos de diabetes *mellitus* tipo 2 mas com BMI mais baixo. Neste trabalho testou-se o efeito da cirurgia sleeve na função vascular de animais diabéticos não obesos submetidos a dieta gorda, através da realização de estudos funcionais na artéria aorta. Analisando os resultados é clara a melhoria no relaxamento induzido pela ach, ou seja, dependente do endotélio nos ratos GK alimentados com dieta gorda e submetidos a gastrectomia vertical.

Em termos de literatura, o mecanismo de ação deste tipo de procedimento na vasculatura é ainda uma incógnita. No entanto, este efeito benéfico da cirurgia pode dever-se ao facto desta reduzir os níveis de moléculas de adesão no endotélio (ICAM-1, E-Selelina e P-Selelina) bem como os níveis de vasoconstritores como a ET-1 (Pontiroli *et al.*, 2004).

Para além das ações vasculares diretas, a gastrectomia vertical está associada com várias alterações hormonais no trato gastrointestinal, o que influencia o metabolismo de todo o organismo.

Este tipo de cirurgia envolve a redução da maior parte do estômago, local onde é sintetizada e segregada a grelina. Esta hormona peptídica promove a ingestão de alimentos e a adiposidade, após este procedimento os níveis desta hormona estão reduzidos em circulação, o que pode explicar a perda de peso. Pelo contrário, os níveis de incretinas, que estão envolvidas na regulação da libertação de insulina, como o GLP-1 e de peptídeos como o PYY sofrem um aumento, o que pode ser responsável pelo aumento da sensibilidade à insulina e pelo controlo glicémico que se verifica após a cirurgia (Moncada *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015)

A diabetes *mellitus* tipo 2 é também caracterizada pela perda progressiva de células beta pancreáticas devido a vários fatores como o *stress* oxidativo, a deposição amilóide e o aumento da apoptose. Verificou-se que a gastrectomia vertical aumenta a massa de células

beta pancreáticas em modelos animais de diabetes *mellitus* tipo 2, o que pode ser devido ao controlo da hiperglicemia, e comprova mais uma vez, o carácter promissor deste tipo de abordagem (Grong *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos no relaxamento induzido pela Ach, após submeter os segmentos de artéria aorta ao inibidor da enzima que sintetiza NO (eNOS), são inesperados uma vez que se observa o relaxamento em todos os grupos de animais. Este relaxamento pode ser devido a outros fatores, para além do NO, que são produzidos pelo endotélio como as prostaciclina, estas são produzidas através do ácido araquidónico pela ação da enzima ciclo-oxigenase e promovem a vasodilatação através do aumento do AMP cíclico o que leva ao relaxamento do músculo liso vascular. Estas desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória, a sua biossíntese no endotélio aumenta aquando de uma inflamação num tecido. Considerando que a dieta gorda e a cirurgia promovem por si só uma resposta inflamatória, é pertinente afirmar que esta resposta na presença do inibidor L-NAME pode dever-se ao ambiente inflamatório propiciado por estas condições (Ricciotti and FitzGerald, 2010).

O endotélio é fundamental na modulação do tónus vascular, este produz substâncias vasodilatadoras como o NO e vasoconstritoras como a ET-I, mantendo assim a homeostase vascular.

A ET-I é um péptido constituído por 21 aminoácidos, produzido pelo endotélio vascular. A sua síntese e libertação é estimulada por fatores como as ROS, tensão mecânica exercida pela corrente sanguínea no endotélio, citocinas entre outros (Richard E. Klabunde, 2009). A sua ação biológica é mediada por dois tipos de recetores: Recetor do tipo A (ET_A) e recetor do tipo B (ET_B). O músculo liso vascular expressa ambos os tipos de recetor, o que promove a vasoconstrição, pelo contrário o endotélio expressa apenas os recetores ET_B, o que leva à síntese e libertação de NO conduzindo ao relaxamento, dependente do endotélio, do músculo liso (Campia *et al.*, 2014).

O seu efeito na regulação do tónus vascular resulta do balanço entre o efeito de vasoconstrição direta dos recetores ET_A e ET_B nas células do músculo liso vascular, e da vasodilatação mediada pelos recetores ET_B no endotélio (Taddei *et al.*, 2001).

De acordo com a literatura, em patologias como a diabetes *mellitus* tipo 2, em que a disfunção endotelial é uma constante, há maior propensão para a produção de vasoconstritores como a ET-I enquanto a produção de NO está comprometida (Böhm *et al.*, 2007).

Logo, neste trabalho em que submetemos os anéis de artéria aorta a concentrações crescentes de ET-I, seria expectável que a contração fosse maior nos animais diabéticos (GK) comparativamente com o controlo (WIC), no entanto, verifica-se que a contração promovida pela ET-I é muito maior nos animais controlo (WIC) quando comparados com os restantes grupos de animais. De acordo com estudos anteriores, verifica-se que a exposição exógena a ET-I provoca menor vasoconstrição em animais diabéticos, o que pode ser devido ao facto dos níveis endógenos deste vasoconstritor já serem por si só elevados devido à diabetes (Taddei *et al.*, 2001). Pelo contrário, nos animais controlo (WIC) a contração promovida pela ET-I é maior uma vez que os níveis de ET-I são mais baixos. Outro mecanismo que pode explicar este resultado, é o balanço na proporção dos tipos de recetores. Verifica-se que após o bloqueio seletivo do recetor ET_A é promovida vasodilatação na diabetes *mellitus* tipo 2, logo o facto dos animais diabéticos apresentarem menor contração pode dever-se à disfunção dos recetores ET_A (Schneider *et al.*, 2007).

Neste trabalho, os efeitos inesperados da ação da ET-I, pode verificar-se que são potenciados pela dieta gorda, uma vez que no grupo de animais diabéticos submetidos a este tipo de dieta a contração é ainda menor pode inferir-se que esta causa maior disfunção e maior desregulação na atividade da ET-I. Por outro lado, através dos resultados obtidos podemos inferir que a cirurgia por si só, parece melhorar este perfil, uma vez que em concentrações finais parece recuperar um perfil com tendência para a vasoconstrição.

Definir a função da ET-I nas doenças vasculares é complicado uma vez que envolve vários mecanismos e intervenientes e também porque esta pode estar aumentada nos tecidos mas a produção de NO pode estar preservada (Böhm and Pernow, 2007). A função concreta da ET-I ao nível vascular é um mecanismo complexo que necessita de mais estudos quer ao nível da função dos recetores quer no contexto de diferentes patologias.

A disfunção endotelial está claramente relacionada com a diabetes *mellitus* tipo 2, e o *stress* oxidativo está intrinsecamente relacionado com esta disfunção, uma vez que as ROS comprometem a biodisponibilidade de NO e promovem a disfunção do endotélio. Devido a estas evidências, considerámos a avaliação do *stress* oxidativo na parede da artéria aorta dos diferentes grupos de animais. Para isto, avaliámos os níveis do anião superóxido, uma vez que este é das principais espécies reativas responsável pela diminuição da biodisponibilidade de NO. Pode então observa-se que no grupo de animais

4. Discussão

sujeitos a dieta gorda há o aumento evidente da fluorescência comparativamente com o grupo controlo (WIC) e com o grupo de animais diabéticos (GK), o que indica que há um aumento da produção do anião superóxido, e conseqüentemente a diminuição dos níveis de NO, o que indica que a dieta gorda provoca disfunção endotelial através do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, é evidente a diminuição da fluorescência na artéria aorta do grupo de animais submetido à cirurgia bariátrica (GKHFDGS), o que indica que esta desempenha um papel promissor ao nível da redução do *stress* oxidativo uma vez que diminui os níveis de anião superóxido e melhora a função endotelial (Sena *et al.*, 2013).

5. Conclusão

5. Conclusão

Neste trabalho avaliámos o potencial da cirurgia bariátrica, nomeadamente do procedimento restritivo: gastrectomia vertical ou *sleeve*, ao nível da Diabetes *mellitus* tipo 2 utilizando, para isso, modelos animais diabéticos não obesos sujeitos a uma dieta rica em gordura.

Verificámos que a dieta gorda promove um ligeiro aumento do peso corporal e do ganho de peso. Nestes parâmetros demonstrámos que a gastrectomia vertical reduz o peso corporal reduzindo o ganho de peso, sendo notoriamente eficaz a este nível, isto pode dever-se ao facto da ingestão de ração ser menor neste grupo de animais devido à remoção da maior curvatura do estômago no procedimento cirúrgico.

Observámos que relativamente ao perfil lípidico, não existem diferenças ao nível do colesterol total. No entanto, os níveis séricos de triglicéridos sofrem um aumento significativo no grupo de animais alimentado com dieta gorda. Neste parâmetro, verifica-se há uma tendência para a gastrectomia vertical diminuir estes níveis.

Considerando a glicemia em jejum, é notório o seu aumento no grupo de animais alimentados com dieta gorda e a cirurgia *sleeve*, embora ligeiramente, tende para melhorar também este parâmetro.

Demonstrámos que a tolerância à glicose bem como a sensibilidade à insulina, se encontram alteradas no grupo de animais alimentados com dieta gorda e que, em ambos, os casos a cirurgia *sleeve* apresenta um perfil que tende para melhorar este parâmetro.

A gastrectomia vertical tem tendência para melhorar os parâmetros acima referidos, no entanto, para se poder afirmar mais concretamente o potencial deste procedimento cirúrgico, é necessário aumentar o número de animais submetidos à cirurgia, para assim se poder analisar com mais eficácia o mecanismo de ação envolvido.

Os resultados evidenciaram a diminuição da vasodilatação dependente do endotélio no grupo de animais submetido a dieta gorda em resposta à acetilcolina o que indica que a função endotelial está comprometida. Contudo, verifica-se que a gastrectomia vertical melhorou a resposta à acetilcolina uma vez que no grupo de animais submetidos a este procedimento cirúrgico a sensibilidade à acetilcolina é maior e ocorre um relaxamento máximo dependente do endotélio com um perfil semelhante ao do rato diabético mantido com dieta normal.

A resposta à acetilcolina na presença do inibidor da enzima eNOS (L-NAME) é contrária ao descrito anteriormente na literatura, pois em todos os grupos de animais ocorre relaxamento da artéria aorta. Isto deve-se possivelmente a outros fatores

5. Conclusão

produzidos pelo endotélio como as prostaciclina, que não foram avaliados neste trabalho.

A contração dependente do endotélio apresenta também um resultado contraditório ao descrito na literatura, uma vez que o grupo de animais controle apresenta maior contração da artéria aorta na presença de endotelina-I, enquanto os grupos de animais sujeitos a dieta gorda e cirurgia têm níveis mais baixos de contração, este fenómeno pode resultar de fatores como a atividade, proporção e localização dos recetores da endotelina-I.

Em relação ao aumento do *stress* oxidativo promovido pela dieta gorda, como podemos verificar pelo aumento dos níveis anião superóxido ao nível da parede da artéria aorta, é evidente que a cirurgia *sleeve* diminui significativamente o *stress* oxidativo no grupo de animais sujeitos à cirurgia.

Com este trabalho demonstrámos que a cirurgia bariátrica, nomeadamente o procedimento restritivo: gastrectomia vertical ou *sleeve*, é eficaz na remissão da Diabetes *mellitus* tipo 2, pois atua a vários níveis principalmente na disfunção endotelial, contribuindo para a promoção da homeostase vascular. Pode inferir-se que este tipo de cirurgia é eficaz em modelos animais diabéticos não obesos mantidos com dieta gorda, e que promove a melhoria desta patologia através de mecanismos que não estão diretamente relacionados com os níveis de glicose nem com os níveis séricos de triglicéridos, os mecanismos pelos quais isto se verifica estão ainda por elucidar, no entanto, a cirurgia bariátrica pode ser uma opção não só para a promoção de perda de peso em casos de obesidade, mas também um terapêutica a adoptar em casos de diabéticos não obesos.

* "F YZyf. .bV]Ug6]V]c[fz Z]Mg

6. Referências Bibliográficas

- Ahmed, K. A., Muniandy, S., and Ismail, I. S. (2010). "Type 2 Diabetes and Vascular Complications :A pathophysiologic view." Biomedical Research **21**(2): 147–155.
- Alberti, K. G. M. M., and Zimmet, P. Z. (1998). "Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part I : Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus" Provisional Report of a WHO Consultation 539–553.
- Al-Goblan, A. S., Al-Alfi, M. A., and Khan, M. Z. (2014). "Mechanism linking diabetes mellitus and obesity." Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 7: 587–591.
- American Diabetes Association. (2004). "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." Diabetes Care **27** (1): 5–10.
- Anyakudo, M. M. and Omotayo, P. (2015). " Effects of High Dietary Fat Intake on Biochemical Variables and Pancreas Histoarchitecture in Diabetic Rats." Journal of Human Nutrition & Food **3** (1): 1053.
- Ashrafian, H., Roux, C. W., Darzi, A., and Athanasiou, T. (2008). "Effects of Bariatric Surgery on Cardiovascular Function." Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine 2091–2102.
- Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA , Park AJ, Ellis SM, Patterson M , Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR (2003). "Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **88**(8): 3989–3992.
- Bays, H., Mandarino, L., and Fronzo, R. A. D. E. (2004). "Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus :Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach." Clin Endocrinol Metab. **89**(2): 463–478.
- Böhm, F., & Pernow, J. (2007). "The importance of endothelin-I for vascular dysfunction in cardiovascular disease." Cardiovascular Research **76**, 8–18.
- Brethauer, S. A., Aminian, A., Romero-Talamás, H., Batayyah, E., Mackey, J., Kennedy, L., Schauer, P. R. (2013). "Can Diabetes Be Surgically Cured?: Long-Term Metabolic Effects of Bariatric Surgery in Obese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." Annals of Surgery **258**(4):628–637.
- Brown, N. K., Zhou, Z., Zhang, J., Zeng, R., Wu, J., Daniel, T., Chang, L. (2014). "Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models Arterioscler Thromb Vasc Biol." **34**(8): 1621–1630.
- Calles-escandon, J., and Cipolla, M. (2001). "Diabetes and Endothelial Dysfunction : A Clinical Perspective." Endocr Rev. **22**(1):36–52.
- Campia, U., Tesauro, M., Di, N., & Cardillo, C. (2014). "The vascular endothelin system in obesity and type 2 diabetes : Pathophysiology and therapeutic implications." Life Sciences, **118**(2), 149–155.

6. Referências Bibliográficas

- Cecilia C. Low Wang, Marc L. Goalstone and Boris Draznin (2004). "Molecular Mechanisms of Insulin Resistance That Impact Cardiovascular Biology." Diabetes, **53**(11): 2735–2740.
- David Dudzinski and Thomas Michel (2007). "Life History of eNOS: Partners and Pathways." Cardiovasc Res. **75**(2): 247–260.
- DeFronzo, R. A. (2010). "Insulin resistance , lipotoxicity , type 2 diabetes and atherosclerosis : the missing links." The Claude Bernard Lecture 1270–1287.
- DeFronzo,E. Ferrannini,P. Zimmet,George Alberti. International Textbook of Diabetes Mellitus, 2 Volume , Volume I (2015).
- Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL (2010). "Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes." Eur J Pharmacol. **636**(1-3):8–17.
- Fernández-alfonso, M. S., Gil-ortega, M., García-prieto, et al., (2013). "Mechanisms of Perivascular Adipose Tissue Dysfunction in Obesity." Int J Endocrinol. 10–13.
- Fowler, M. J. (2008). "Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes." Clinical Diabetes **26**(2): 77–82.
- Gao, Y., Takemori, K., Su, L., An, W et al., (2006). "Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction :The role of superoxide anion." Cardiovasc Res. **71**(2):363–73.
- Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A., Hwang, et al., (2004). "Inhibition of Insulin Sensitivity by Free Fatty Acids Requires Activation of Multiple Serine Kinases in 3T3-L1 Adipocytes." Mol Endocrinol.(8):2024–34.
- Geltrude Mingrone, Simona Panunzi, et al., (2012). "Bariatric Surgery versus Conventional Medical Therapy for Type 2 Diabetes." N Engl J Med **366**:1577–1585
- Giacco, F. and Brownlee, M. (2010). "Oxidative stress and diabetic complications." Circulation Research **107**(9): 1058–1070.
- Guelho, D., Paiva, I., & Carvalheiro, M. (2015). "Diabetes e Metabolismo Diabetes mellitus – um « continuum » fisiopatológico." Revista Portuguesa de Endocrinologia **8**(1), 44–49.
- Hwang, M., & Kim, S. (2014). "Type 2 Diabetes : Endothelial dysfunction and Exercise." J Exerc Nutrition Biochem **18**(3), 239–247.
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 7ed.* Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.
- Karpe, F., Dickmann, J. R., & Frayn, K. N. (2011). "Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation." Diabetes (10):2441–9
- KJ Chang-Chen, R Mullur, and E. Bernal-Mizrachi (2008). "β-cell Failure as a Complication of Diabetes." Rev Endocr Metab Disord **9**(4): 329–343.

6. Referências Bibliográficas

Kolluru, G. K., Bir, S. C., and Kevil, C. G. (2012). "Endothelial Dysfunction and Diabetes : Effects on Angiogenesis , Vascular Remodeling , and Wound Healing." International Journal of Vascular Medicine.

Kubisz, P., Stančiaková, L., Staško, J., Galajda, P., & Mokáň, M. (2015). "Endothelial and platelet markers in diabetes mellitus type 2." World Journal of Diabetes **6**(3): 423–431.

Kulkarni RN(2004). "The islet beta-cell." Int J Biochem Cell Biol, **36**(3):365–71.

Lars Sjöström, Anna-Karin Lindroos, Markku Peltonen, *et al.*, (2004). "Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk Factors 10 Years after Bariatric Surgery" New England journal, 2683–2693.

Lassègue, B., and Griendling, K. K. (2010). "NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature." Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology **30**(4): 653–661.

Lee RM, Lu C, Su LY, Gao YJ (2009). "Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue." J Hypertens **27**:782–790.

Lee, M. H., Chen, S., Tsao, C., & Wu, C. (2014). "Perivascular Adipose Tissue Inhibits Endothelial Function of Rat Aortas via Caveolin-1." PLoS ONE **9**(6).

Li, H., Li, H., Bao, Y., Zhang, X., and Yu, Y. (2011). "Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor- κ B pathway in rat aorta." International Journal of Cardiology **152**(2): 218–224.

Lohn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM (2002). "Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor." Faseb J **16**:1057–1063.

Manrique, C., Lastra, G., and Sowers, J. R. (2014). "New insights into insulin action and resistance in the vasculature." Annals of the New York Academy of Sciences **1311**(1): 138–150.

Masayasu Kojima and Kenji Kangawa (2005). "Ghrelin: Structure and Function" Physiol Rev **85**: 495–522.

Mather, K. J., Steinberg, H. O., and Baron, A. D. (2013). "Insulin resistance in the vasculature." J Clin Invest **123**(3), 1003–1004.

Meijer, R. I., Serne, E. H., & Smulders, Y. M. (2011). "Perivascular Adipose Tissue and Its Role in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease." Curr Diab Rep. **11**(3):211–7.

Müller-Stich BP, Senft JD, Warschkow R. *et al.*, (2015). "Surgical versus medical treatment of type 2 diabetes mellitus in nonseverely obese patients: a systematic review and meta-analysis." Ann Surg. **261**(3):421–9.

Muniyappa, R., and Sowers, J. R. (2013). "Role of insulin resistance in endothelial dysfunction." Rev Endocr Metab Disord. 5–12.

6. Referências Bibliográficas

- Muniyappa, R., Montagnani, M., *et al.*, (2015). “Cardiovascular Actions of Insulin.” Endocr Rev. (5):463–91.
- Murphy, M. P. (2009). “How mitochondria produce reactive oxygen species.” Biochemical Journal **417**(1): 1–13.
- Nauck, M.A., Baller, B., and Meier, J.J. (2004). “Gastric Inhibitory Polypeptide and Glucagon-Like Peptide-I in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes.” Diabetes **53** (3):190–6.
- Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D., and Grune, T. (2015). “Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus.” Biomolecules **5**(1):194–222.
- Oriowo, M.A. (2015). “Perivascular Adipose Tissue, Vascular Reactivity and Hypertension.” Med Princ Pract. **24**(1), 29–37.
- Ozen, G., Daci, A., Norel, X., & Topal, G. (2015). “Human perivascular adipose tissue dysfunction as a cause of vascular disease : Focus on vascular tone and wall remodeling.” European Journal of Pharmacology **766**:16–24.
- Paneni, F., Beckman, J. A., Creager, M. A., and Cosentino, F. (2013). “Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I.” European Heart Journal **34**(31): 2436–2443.
- Poitout, V., and Robertson, R. P. (2008). “Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction.” Endocrine Reviews **29**(3): 351–366.
- Potenza, Maria A., Gagliardi, Sara, Nacci Carmela, *et al.*, (2009). “Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Targets” Current Medicinal Chemistry **16** (1): 94–112.
- Ralph A. DeFronzo and Devjit Tripathy (2009). “Skeletal Muscle Insulin Resistance is the Primary Defect in Type 2 Diabetes.” Diabetes Care **32**(2): 157–163.
- Ranganath Muniyappa and James R. Sowers (2013). “Role of Insulin Resistance in Endothelial Dysfunction” Endocr Metab Disord **14**(1): 5–12.
- Ranganath Muniyappa, Micaela Iantorno and Michael J. Quon (2008). “An Integrated View of Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction.” Endocrinol Metab Clin North Am **37**(3).
- Saisho, Y. (2015). “ β -cell dysfunction : Its critical role in prevention and management of treatment of type 2 diabetes mellitus in nonseverely obese patients: a systematic review and meta-analysis.” Ann Surg. **261**(3):421–9.
- Saisho, Y. (2015). “ β -cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of type 2 diabetes.” World Journal of Diabetes **6**(1):109–124.

6. Referências Bibliográficas

- Sena, C. M., Pereira, A. M., and Seïça, R. (2013). "Biochimica et Biophysica Acta Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease." BBA - Molecular Basis of Disease **1832**(12): 2216–2223.
- Szasz, T., Bomfim, G. F., & Webb, R. C. (2013). "The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis." Vascular Health and Risk Management **9**: 105–116.
- Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Sudano, I., & Magagna, A. (2001). "Role of Endothelin in the Control of Peripheral Vascular Tone in Human Hypertension." Heart Failure Reviews **6**: 277–285.
- Tangvarasittichai, S. (2015). "Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus." World Journal of Diabetes **6**(3): 456–480.
- Tsutsui, M., Tanimoto, A., Tamura, M., Mukae, H., Yanagihara, et al., (2015). "Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice." Journal of Pharmacological Sciences **127**(1): 42–52.
- Verlohren, S., Dubrovskaja, G., Tsang, S., Essin, et al., (2004). "Visceral Periadventitial Adipose Tissue Regulates Arterial Tone of Mesenteric Arteries." Hypertension **27**: 271–277.
- Vlassara, H., and Uribarri, J. (2014). "Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both?" Current Diabetes Reports **14**(1): 453.
- Wei-Jei Lee, Keong Chong, Kong-Han Ser, et al., (2011). "Gastric Bypass vs Sleeve Gastrectomy for Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Controlled Trial." Arch Surg. **146**(2): 143–148.
- Yunmee Lho, Carel W. le Roux, et al., (2015). "Changes in Glucose Metabolism in Vertical Sleeve Gastrectomy." Obesity Surgery **25** (11): 2002–2010.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. S. (2015). "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS." Journal of Pharmacological Science **129**(2): 83–94.
- Zhuo Fu, Elizabeth R. Gilbert, and Dongmin Liu (2013). "Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes." Curr Diabetes Rev (1): 25–53.