

IRRIGAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO APÓS EXPANSÃO INDUZIDA POR DIETA GORDA E DISFUNÇÃO VASCULAR INDUZIDA POR GLICAÇÃO

José Almeida ¹, Tiago Rodrigues, Paulo Matafome e Raquel Seça

Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Contactos ¹

Morada: Polo III da Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina, Subunidade 1, 1º andar, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 Coimbra, Portugal.

E-mail: josepauloalmeida92@gmail.com

Telefone: 912748913

Trabalho financiado por:

IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)

RESUMO

Objetivo: A hipóxia do tecido adiposo, num contexto de obesidade, pode ser explicada por uma excessiva hiperplasia e hipertrofia de adipócitos, face à rede vascular que a acompanha. No entanto, outros fatores poderão condicionar esta hipóxia, incluindo a disfunção microvascular do tecido adiposo. Neste trabalho, investigámos o papel da glicação induzida por metilglioal (MG) na disfunção do tecido adiposo subcutâneo associado a uma expansão rápida induzida por dieta gorda.

Métodos: Ratos Wistar foram alimentados com dieta saudável (grupo Ct) tratados com MG (grupo MG), alimentados com uma ração rica em triglicéridos (grupo HFD), ou expostos a ambas as condicionantes (grupo HFDMG). Um quinto grupo de ratos Goto-Kakizaki (grupo GK) foi utilizado como modelo não obeso de diabetes tipo 2. Em cada um dos grupos, aplicámos pioneiramente a ressonância magnética para avaliação da perfusão do tecido adiposo, avaliámos a hipóxia nesse tecido e as suas repercussões metabólicas sistémicas.

Resultados: Verificámos que os grupos tratados com MG (MG e HFDMG) apresentaram uma redução da perfusão do tecido adiposo subcutâneo. No entanto somente o grupo HFDMG demonstrou hipóxia significativa neste tecido, sugerindo que esta é consequência da interação da glicação com a rápida expansão do tecido adiposo, mas não de cada um destes fatores individualmente. O grupo HFDMG foi também o único (a par do controlo positivo GK) a demonstrar insulino-resistência, aumento de ácidos gordos livres e intolerância à glicose, repercussões metabólicas da disfunção adiposa constatada.

Conclusão: A glicação induzida por MG, associada a uma rápida expansão do tecido adiposo, associa-se a disfunção vascular local e hipóxia. A hipóxia do tecido adiposo, embora teoricamente um processo localizado, tem repercussões sistémicas a nível metabólico características da diabetes tipo 2, incluindo insulino-resistência e intolerância à glicose.

PALAVRAS-CHAVE

Tecido adiposo; metilglioal; glicação; diabetes; hipóxia; disfunção vascular;

INTRODUÇÃO

Aliado ao sedentarismo, o consumo excessivo de alimentos hipercalóricos é responsável pela epidemia de obesidade que caracteriza as culturas Ocidentais, sendo a obesidade abdominal fator de risco *major* para desenvolver síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (1). O tecido adiposo depende de uma vascularização apropriada para o seu crescimento e função, sendo responsável pelo aporte de oxigênio e nutrientes, bem como pela remoção de metabolitos, trânsito de células com função imune e fornecimento de hormonas e fatores de crescimento. No entanto, ao contrário do que acontece com a maioria dos órgãos e tecidos humanos, em que o seu crescimento se dá ao longo do desenvolvimento embrionário e é relativamente constante na fase adulta, o tecido adiposo pode aumentar o seu tamanho várias vezes em qualquer altura da vida, chegando a ocupar mais de 40% da composição corporal em indivíduos obesos (2).

Uma vez que esta expansão do tecido adiposo é acompanhada pela rede vascular, a compreensão dos mecanismos moleculares e celulares da angiogénese são fundamentais para a compreensão da importância funcional da sua arquitetura. Atualmente, existe evidência de que é possível limitar a expansão do tecido adiposo através da diminuição do seu aporte vascular (3). No entanto, experiências anteriores baseadas neste tipo de abordagem revelaram que esta está associada ao desenvolvimento de dismetabolismo, com maior lipotoxicidade e insulino-resistência hepática e músculo-esquelética. Vários estudos sugerem que a rápida expansão do tecido adiposo não é acompanhada do crescimento adequado da rede vascular e que esse desequilíbrio poderá condicionar hipóxia (4, 5, 6). Essa hipóxia, por sua vez, poderá ativar mecanismos inflamatórios e condicionar resistência à insulina (6). No entanto, tem sido recentemente posto em causa que uma rede vascular insuficientemente expandida face à quantidade total de tecido adiposo a vascularizar seja o principal

responsável pela hipóxia verificada no tecido adiposo de modelos obesos, em detrimento de outras condicionantes, nomeadamente a disfunção microvascular (7).

De facto, o nosso grupo demonstrou previamente que a deposição de metilglicoxal (MG), um precursor de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs), induzia alterações estruturais e funcionais no tecido adiposo (8) e diminuía a sua adaptação metabólica a isquemia induzida cirurgicamente (9). Vários outros estudos demonstraram a relação causal entre disfunção vascular e a acumulação de AGEs (10, 11, 12). Um dos mecanismos para esta disfunção resulta da formação de ligações cruzadas com proteínas da matriz extracelular e plasma, alterando a sua estrutura e função. A ligação dos AGEs ao seu recetor (RAGE) na superfície celular desencadeia a ativação de vias pró-inflamatórias com formação do fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) e fibrose. Ao contrário do que se verifica com outras complicações microvasculares da diabetes tipo 2, como a retinopatia ou a nefropatia, a disfunção da microvasculatura do tecido adiposo parece ser menos dependente da hiperglicemia ou, pelo menos, depender também significativamente de outros fatores. A glicação poderá verificar-se em diabéticos tipo 2 ou pré-diabéticos, mesmo antes de uma hiperglicemia evidente, sugerindo uma disfunção microvascular associada aos AGE longa e progressiva no tempo. A diabetes tipo 2, que afeta cerca de 347 milhões de pessoas mundialmente (13), e a pré-diabetes, com uma percentagem ainda maior da população afetada, são das mais frequentes comorbilidades da obesidade. A diabetes tipo 2 caracteriza-se por níveis elevados de glicémia num contexto de resistência à ação da insulina e, posteriormente, alterações de síntese e secreção da hormona (14). A resistência à insulina poderá ser de tipo central, que ocorre a nível hepático, e resulta numa supressão ineficiente da produção de glicose pela insulina, ou de tipo periférico, que resulta numa diminuição da captação e utilização da glicose pelas células adiposas e musculares em resposta à insulina (15). Embora o mecanismo responsável pela resistência à insulina não seja ainda totalmente conhecido, sabe-se que resulta de um componente genético e de um componente ambiental.

Entre os mediadores potenciais que afetam as resistências central e periférica à insulina foram identificados os ácidos gordos livres, o sistema nervoso autónomo, as adipocitocinas como a leptina e a adiponectina, e o peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) (16).

A síndrome metabólica é definida como um conjunto de fatores de risco de origem metabólica, que frequentemente se acompanham de aumento de risco cardiovascular e desenvolvimento de diabetes tipo 2, cuja fisiopatologia se relaciona com a obesidade. De acordo com a American Heart Association, a definição desta síndrome implica três ou mais dos seguintes: aumento do perímetro de circunferência abdominal, aumento do valor dos triglicérides séricos, diminuição da concentração sérica de colesterol HDL, hipertensão arterial e aumento da glicémia no jejum. O tecido adiposo é, nesta situação, responsável pela produção de hormonas e citocinas pro-inflamatórias, com repercussões sistémicas (17).

A elevada prevalência de síndrome metabólica indicia que, numa porção significativa de doentes obesos, coexistam um aumento de tecido adiposo e alterações relacionadas com a deposição de AGEs. No entanto, nenhum estudo foi ainda desenhado de forma a avaliar os efeitos da deposição de AGEs na adaptação vascular do tecido adiposo num contexto de rápida expansão, como aquele que se verifica no desenvolvimento da obesidade. Esta acumulação progressiva poderá induzir disfunção microvascular, contribuindo para uma expansão deficitária da rede vascular e conseqüentemente uma disfunção do tecido adiposo como órgão endócrino, com produção de mediadores pró-inflamatórios e conseqüente disfunção metabólica, incluindo insulino-resistência que, por sua vez, tem como conseqüência o agravamento da hiperglicemia e da deposição de AGEs, alimentando um ciclo vicioso que se vai ampliando com a progressão no tempo (18, 19, 20).

O objetivo deste trabalho é avaliar o papel da glicação induzida por MG na disfunção do tecido adiposo associado a uma expansão rápida induzida por dieta gorda.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelos animais: Foram utilizados ratos Wistar e Goto-Kakizaki das nossas colónias do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, mantidas em condições *standart* de ventilação, temperatura (22-24°C), humidade (60-70%) e luminosidade (12 horas de luz e 12 horas de escuridão) com acesso livre a água e alimentação. O protocolo experimental foi aprovado pela comissão de ética local e os procedimentos foram realizados por utilizadores credenciados (FELASA).

Grupos experimentais: Ratos Wistar com 8 meses, do sexo masculino, foram divididos em 4 grupos ($n=12/$ grupo): 1) grupo controlo (Ct) alimentado com dieta *standart* AO3 (5% triglicéridos e 45% carboidratos, 213 HF, SAFE, França); 2) grupo metilglioxal (MG) alimentado com dieta *standart* e administração de MG; 3) grupo alimentado com dieta gorda – 40% de triglicéridos e 10% de carboidratos (231 HF, SAFE, França) (HFD); 4) grupo alimentado com dieta gorda e com administração de MG (HFDMG). Um quinto grupo (GK) foi utilizado como modelo para glicação endógena e consistiu em ratos Goto-Kakizaki, um modelo não obeso de diabetes tipo 2, alimentados com uma dieta *standart*.

Dieta e administração de MG: Dieta gorda foi administrada aos ratos durante 18 semanas, dos 8 aos 12 meses de idade. O metilglioxal (Sigma, EUA) foi diluído na água (100mg/Kg/dia), com ajustes semanais proporcionais ao peso.

Peso corporal total, hemoglobina glicada (HbA1c), glicémia no jejum, tolerância à glicose: Em ratos com jejum de 18 horas foi determinado o peso corporal e medida, por punção na veia caudal, a hemoglobina glicada, bem como a glicémia no jejum e após 1 e 2 horas de administração de glicose na dose 1.8g/kg.

Ressonância Magnética: Foi realizado um estudo dinâmico realçado por contraste (DCE) utilizando um aparelho de ressonância magnética BioSpec 9.4 (Bruker, Biospin, Ettlingen, Germany). Os ratos ($n=6$ por grupo) foram anestesiados com isoflurano (2-3%) com 100%

de oxigênio, temperatura corporal de 37°C e monitorização respiratória (SA Instruments SA, Stony Brook, USA). Foi utilizada uma bobina de volume corporal transmitido/recebido com 71mm/112mm de diâmetro interno e externo, respetivamente. As imagens foram adquiridas com uma sequência gradiente-eco saturada em gordura ponderada em T1 com os seguintes parâmetros: TR \ /TE=301.5 \ /2.5 ms, FA = 50 °, FOV = 65 × 65 mm², tamanho de matriz = 169 × 169, 40 fatias (orientação axial), espessura de corte = 1,0 mm, 40 dinâmicas, tempo de varredura por dinâmica = 51 segundos, tempo varredura total = 34 minutos. O agente de contraste (Gadovist®, LUSAL, Portugal) foi administrado por via intraperitoneal, após a aquisição de 3 dinâmicas de base. Os dados foram analisados *off-line* utilizando software próprio implementado no Matlab (v2013a, Mathworks, Natick, Massachusetts) para obter curvas de realce de tecido. A variação da intensidade de sinal como função do tempo foi quantificada em ROIs que foram aplicados no tecidos adiposo subcutâneo e a área sob a curva (AUC) foi calculada para quantificar indiretamente a perfusão.

Colheita de sangue e tecido adiposo: Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/kg, im, Parke-Davis, Ann Arbor, EUA) e cloreto de clorpromazina (2,65 mg/kg, im, Lab Vitória, Portugal) e foi colhido sangue por punção cardíaca. O soro e o plasma foram recolhidos e armazenados como descrito noutros trabalhos (8). Após o sacrifício, por deslocamento cervical, as amostras de tecido adiposo subcutâneo inguinal foram colhidas e congeladas a -80°C.

Medições séricas de triglicerídeos e ácidos gordos livres: A trigliceridémia foi determinada utilizando *kits* comerciais a partir de sangue colhido por punção cardíaca (Olympus-Diagnóstica, Portugal, Produtos de Diagnóstico SA, Portugal). O nível de ácidos gordos livres foi determinado recorrendo ao FFA Assay Kit (ZenBio, NC, USA).

Análise das regiões de hipóxia de tecido adiposo: As regiões de hipóxia no tecido adiposo subcutâneo foram determinadas por meio de injeção intraperitoneal da sonda pimonidazole (60 mg/kg, durante 40 minutos, $n = 3$ /grupo). Após o sacrifício, o tecido foi imediatamente

recolhido para transferência de *Western Blot* e análise imuno-histoquímica utilizando um anticorpo específico (Sonda de Hipóxia Kit, Millipore, EUA).

Western Blot: As amostras de tecido adiposo subcutâneo (300 mg) foram homogeneizadas em tampão de lise [25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM PMSF e 40 µl/g de inibidor de proteases (Sigma, USA), pH = 7.7] e centrifugadas a 14000 g, durante 20 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados novamente e a concentração de proteína foi determinada usando o método BCA (Pierce, EUA). As amostras foram separadas em gel de acrilamida desnaturante e transferidas para membranas PVDF. As membranas foram bloqueadas com solução TBST [25mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% Tween, pH=7.6, 5% BSA]. A incubação das membranas com os respectivos anticorpos foi feita durante a noite, a 4°C, e durante 2 horas, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários (anti-rato, GE Healthcare, RU; anti-coelho e anti-cabra, Bio-Rad, EUA). As membranas foram incubadas com ECF e ECL (Bio-Rad, EUA) e reveladas com o sistema Typhoon (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) e sistema Versadoc (Bio-Rad, EUA), respetivamente. A análise das membranas foi feita com recurso ao software Image Quant®, Molecular Dynamics, EUA.

Histologia: Foram obtidos cortes de tecido (4 µm) adiposo parafinizados ($n = 3/\text{grupo}$). A coloração PAS foi utilizada para avaliar a acumulação de glicoconjugados. O tricrómio de Masson foi utilizado para avaliar regiões fibróticas. As imagens foram capturadas em microscópio Zeiss com câmara incorporada (Alemanha). O número de adipócitos foi determinado em 10 campos por corte e a área média do adipócito foi determinada.

Análise estatística: Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média por grupo. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para determinar diferenças estatísticas entre os grupos, utilizando o *software* SPSS (IBM, NY, EUA). $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Parâmetros sistêmicos

Tabela 1: Ração ingerida, peso corporal, glicémia em jejum, HbA1c, glicémia às 2 horas e triglicérides séricos.

Group	Ct	MG	HFD	HFDMG	GK
Ração (g/rato/dia)	22.9±0.7	24.3±1.6	15.1±1.1 **##	14.4±0.7 **##	25.7±0.6 \$\$\$ &&&
Peso (g)	508.8±11.4	508.9±18.4	652.7±35.8 **##	571.6±27.3	398.7±7.7 *#\$\$\$ &&&
Glicémia em jejum (mg/dl)	68.5±2.0	70.6±1.4	70.9±2.0	71.1±1.6	91.7±3.0 ***#S&
HbA1c (%)	3.2±0.1	3.3±0.1	3.3±0.1	3.5±0.1	5.6±0.4 ***### \$\$\$ &&&
Glicémia (mg/dl) 2h	77.0±3.1	84.8±2.2	123.6±8.4 **##	143.6±9.7 ***###	305.5±14.8 ***### \$\$\$ &&&
Triglicérides (mg/dl)	77.2±6.4	69.3±10.7	77.8±5.4	62.3±3.2	160.1±23.1 ***### \$\$\$ &&&

Ct- ratos Wistar com 12 meses; MG - ratos Wistar com administração de MG entre 8-12 meses de idade; HFD – ratos Wistar submetidos a dieta gorda entre 8-12 meses de idade; HFDMG – ratos Wistar submetidos a dieta gorda e administração de MG entre 8-12 meses de idade; GK - ratos Goto- Kakizaki com 12 meses de idade. As barras representam médias ± erro-padrão da média. * vs Controlo; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG. 1 símbolo p<0.05; 2 símbolos p<0.01; 3 símbolos p<0.001.

Apenas no grupo HFD se verificou um aumento de peso estatisticamente significativo. A glicémia às 2 horas foi superior nos grupos tratados com dieta gorda, sendo mais significativa no grupo HFDMG. O grupo GK manifesta alterações em todos os parâmetros sistêmicos, funcionando como controlo positivo. Estes resultados são complementares com os da Figura 5.

A glicação induzida por metilglioxal resulta em aumento de fibrose no tecido adiposo subcutâneo.

O aumento da coloração PAS foi observada nos grupos tratados com MG (MG e HFDMG) e nos ratos GK (Figura 1A). Foram observados resultados semelhantes com a coloração Tricrômio de Masson (Figura 1B). A N^ε(carboxyethyl)lysina (CEL) é um AGE especificamente derivado da ligação cruzada do MG com um único resíduo de lisina, pelo que os seus níveis no tecido adiposo foram utilizados para avaliar a glicação induzida por MG. Os níveis de CEL foram significativamente superiores nos grupos HFDMG e GK. (Figura 1C).

A glicação diminui a perfusão do tecido adiposo subcutâneo.

Foi utilizada neste projeto uma técnica pioneira na avaliação da perfusão de tecido adiposo através de ressonância magnética (Figura 2). Demonstrámos uma diminuição da perfusão do tecido adiposo nos grupos tratados com MG (MG, HFDMG), bem como nos ratos GK, modelo não obeso de diabetes tipo 2.

A glicação é causa de hipóxia do tecido adiposo subcutâneo durante a sua expansão.

A hipóxia no tecido adiposo subcutâneo foi quantificada através da acumulação de aductos com uma sonda de hipóxia – pimonidazole. Demonstrámos que no grupo HFDMG, em que a uma expansão de tecido adiposo induzida por dieta gorda se associa glicação induzida por MG, se verifica um incremento de hipóxia estatisticamente significativo (Figura 3). A expansão do tecido adiposo foi avaliada através da área média de adipócito, que consiste no número de adipócitos por campo, tendo sido avaliados 10 campos por rato (Figura 4) e do peso total (Tabela 1). Verificámos que os ratos do grupo HFD apresentaram aumento significativo destes parâmetros, verificando-se o oposto nos ratos do grupo GK.

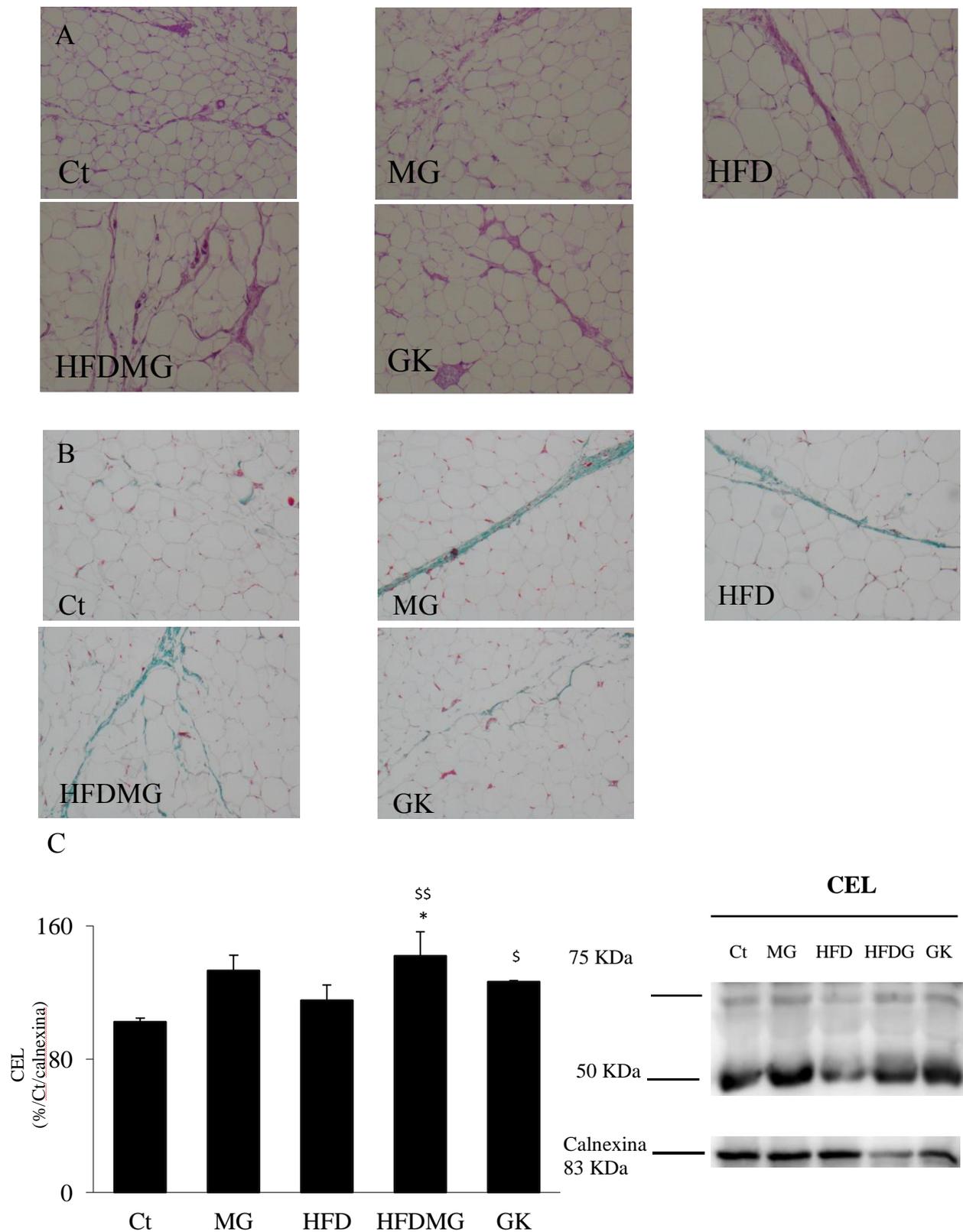


Figura 1: Análise histológica de tecido adiposo subcutâneo, com coloração PAS (100X) (A) e coloração Tricrômio de Masson (100X) (B). Níveis de CEL no tecido adiposo subcutâneo (C), calculados como percentagem do Ct, acompanhados de Western Blot representativo. Ct – ratos Wistar com 12 meses de idade; Ct – ratos Wistar com 12 meses; MG - ratos Wistar com administração de MG entre 8-12 meses de idade; HFD – ratos Wistar submetidos a dieta gorda entre 8-12 meses de idade; HFDMG – ratos Wistar submetidos a dieta gorda e administração de MG entre 8-12 meses de idade; GK - ratos Goto- Kakizaki com 12 meses de idade. As barras representam médio \pm erro-padrão. * vs Ct; \$ vs HFD; 1 símbolo $p < 0.05$; 2 símbolos $p < 0.01$

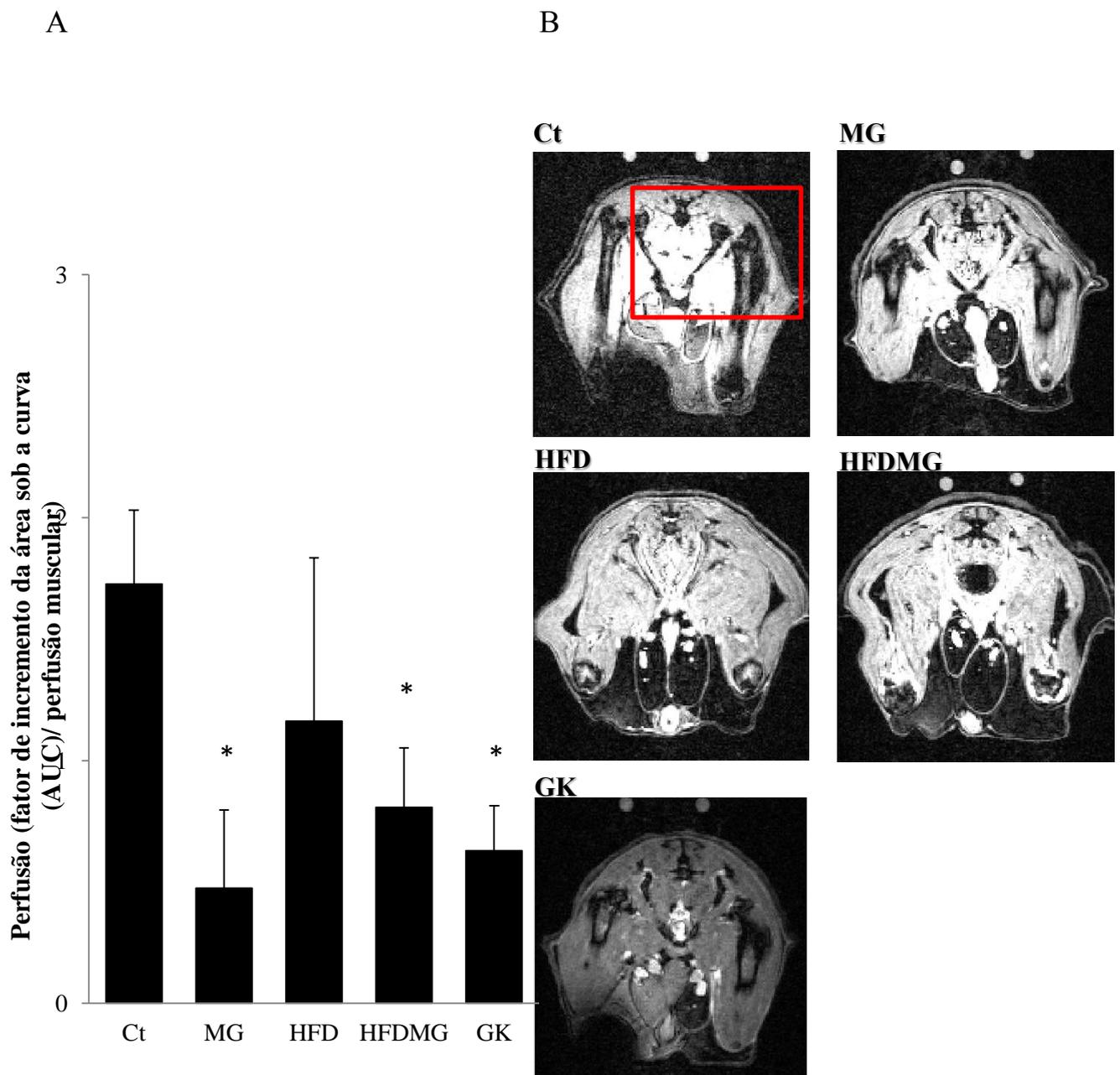


Figura 2: Relação entre a perfusão de tecido adiposo subcutâneo e muscular (A) e imagem representativa (B), avaliada através da acumulação de produto de contraste (gadolínio) por ressonância magnética; Ct – ratos Wistar com 12 meses de idade; MG - ratos Wistar com administração de MG entre 8-12 meses de idade; HFD – ratos Wistar submetidos a dieta gorda entre 8-12 meses de idade; HFDMG – ratos Wistar submetidos a dieta gorda e administração de MG entre 8-12 meses de idade; GK - ratos Goto- Kakizaki 12 meses de idade; As barras representam médias \pm erro-padrão; * vs Ct; 1 símbolo $p < 0,05$;

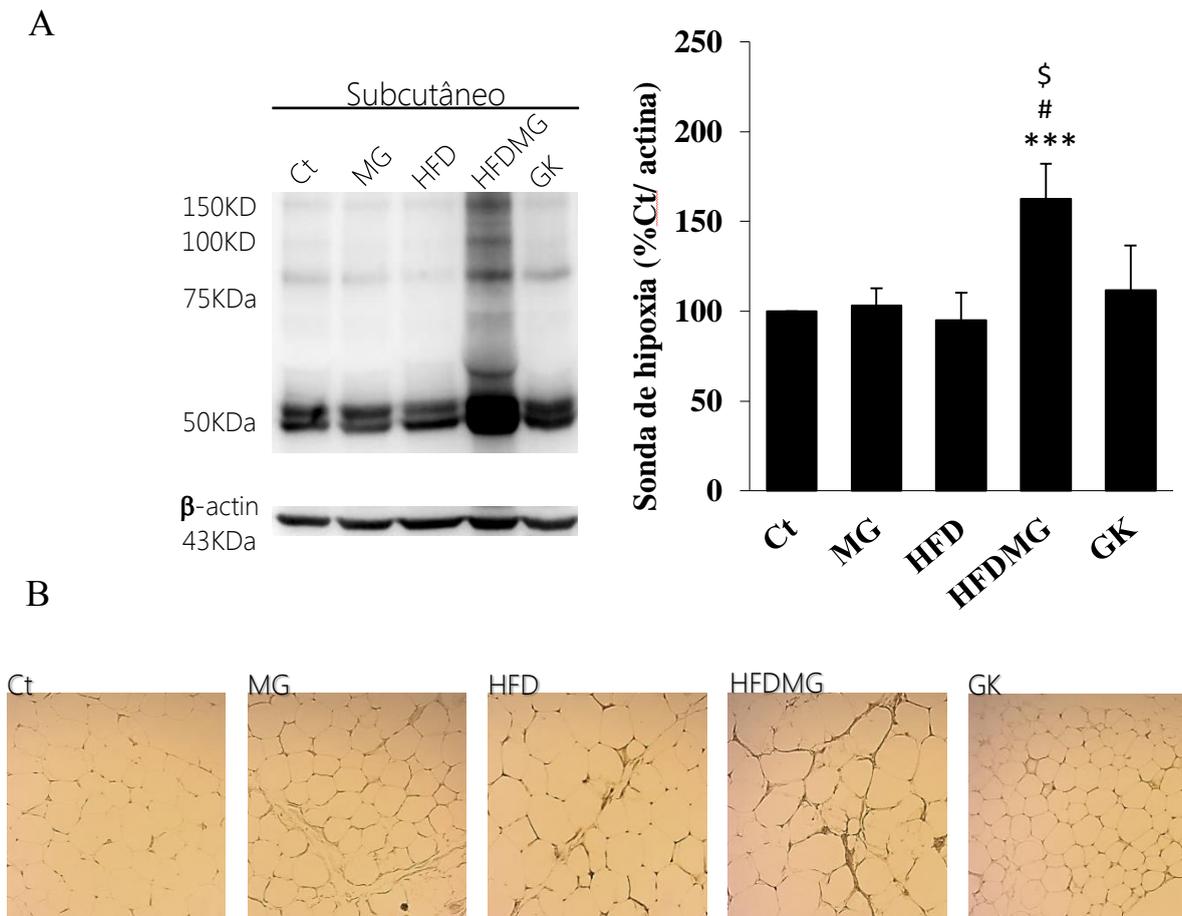


Figura 3: Quantificação por Western Blotting (A) e por imuno-histoquímica (B) dos aductos formados com a sonda de hipóxia pimonidazole. Ct – ratos Wistar com 12 meses de idade; Ct- ratos Wistar com 12 meses; MG - ratos Wistar com administração de MG entre 8-12 meses de idade; HFD – ratos Wistar submetidos a dieta gorda entre 8-12 meses de idade; HFDMG – ratos Wistar submetidos a dieta gorda e administração de MG entre 8-12 meses de idade; GK - ratos Goto- Kakizaki 12 meses de idade. As barras representam médias \pm erro-padrão; * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; 1 símbolo $p < 0.05$; 3 símbolos $p < 0.001$.

A glicação, quando associada a expansão do tecido adiposo induzida por dieta gorda, tem repercussões sistêmicas.

Sendo o tecido adiposo um importante órgão-alvo da insulina, uma diminuição nos níveis de expressão da forma fosforilada (ativa) do seu recetor são um bom indicador de resistência periférica. Demonstrámos uma diminuição da expressão da forma fosforilada do recetor da insulina a nível do tecido adiposo subcutâneo nos grupos HFDMG e GK, sem alterações da expressão da forma total do recetor. Os mesmos grupos, HFDMG e GK, apresentaram aumento da concentração sérica de ácidos gordos livres e diminuição da

tolerância à glicose. O grupo HFD também apresentou diminuição da tolerância à glicose, embora não tão marcada como os grupos previamente destacados (Figura 5). Como é visível na Tabela 1, embora glicemia às 2 horas tenha sido superior em ambos os grupos tratados com dieta gorda, foi mais significativa no grupo HFDMG.

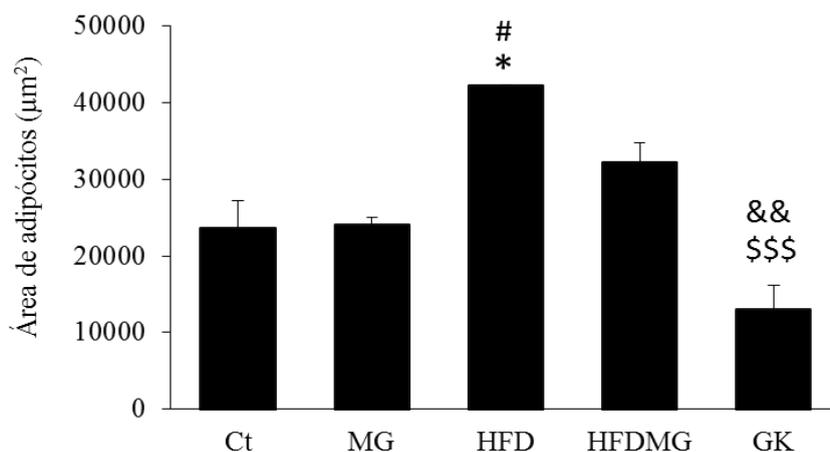


Figura 4: Área média de adipócito, avaliada através do número de adipócitos por campo, tendo sido avaliados 10 campos por rato; Ct – ratos Wistar com 12 meses de idade; MG - ratos Wistar com administração de MG entre 8-12 meses de idade; HFD – ratos Wistar submetidos a dieta gorda entre 8-12 meses de idade; HFDMG – ratos Wistar submetidos a dieta gorda e administração de MG entre 8-12 meses de idade; GK - ratos Goto- Kakizaki 12 meses de idade; As barras representam médias \pm erro-padrão; * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG; 1 símbolo $p < 0.05$; 2 símbolos $p < 0.01$; 3 símbolos $p < 0.001$.

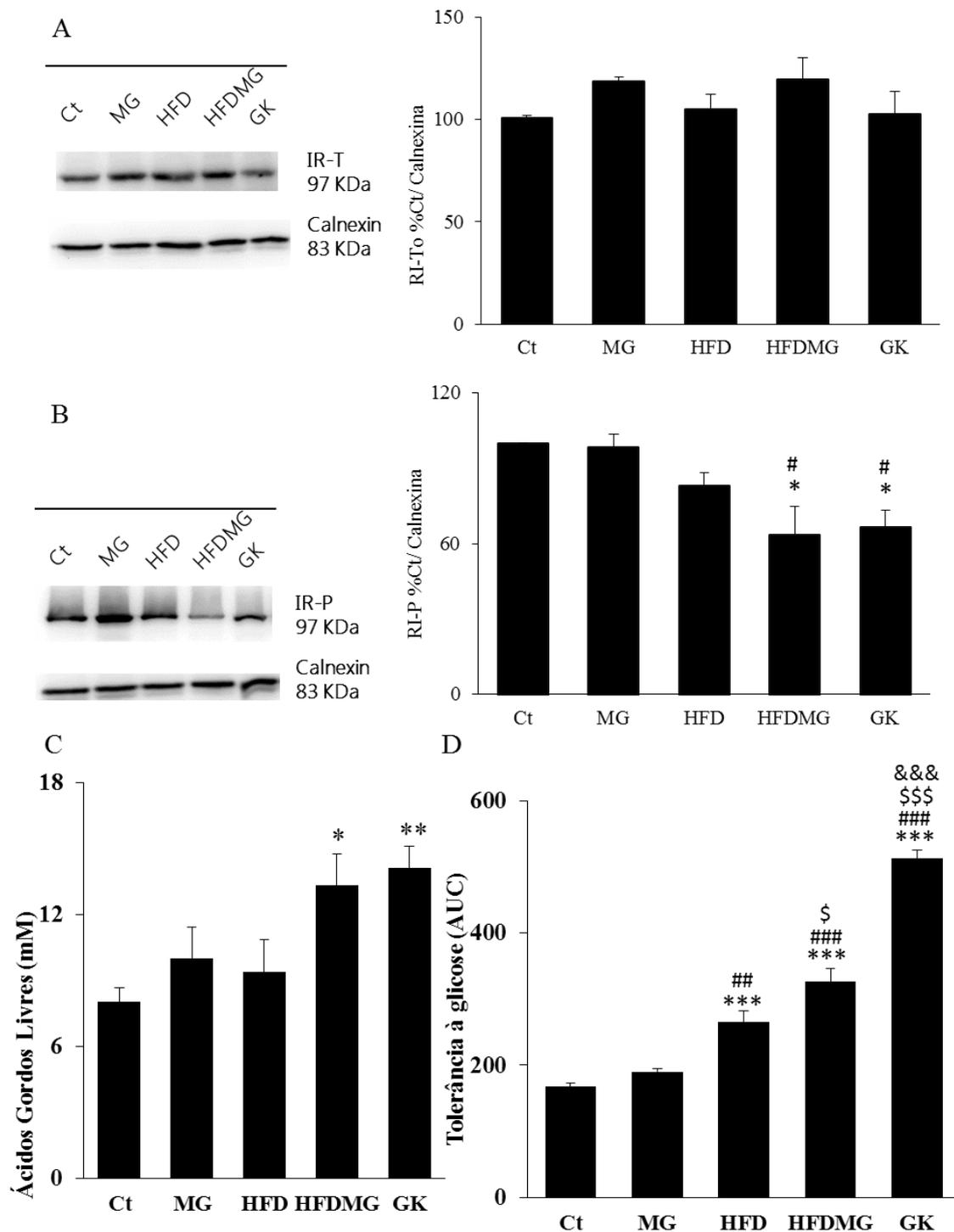


Figura 5: Alterações metabólicas. Formas total (A) e fosforilada (B) do recetor da insulina, quantificadas por *Western Blot* no tecido adiposo subcutâneo. Concentração de ácidos gordos livres no sangue periférico (C) e intolerância à glicose avaliada a partir da área sob a curva (AUC) calculada num teste de tolerância intraperitoneal à glicose (D); Ct – ratos Wistar com 12 meses de idade; MG - ratos Wistar com administração de MG entre 8-12 meses de idade; HFD – ratos Wistar submetidos a dieta gorda entre 8-12 meses de idade; HFDMG – ratos Wistar submetidos a dieta gorda e administração de MG entre 8-12 meses de idade; GK - ratos Goto- Kakizaki 12 meses de idade; As barras representam médias \pm desvio-erro; * vs Ct; # vs MG; \$ vs HFD; & vs HFDMG; 1 símbolo p <0.05; 2 símbolos p <0.01; 3 símbolos p <0.001.

DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se o papel da glicação induzida por MG na disfunção do tecido adiposo subcutâneo, aquando da sua rápida expansão induzida por dieta gorda. Avaliaram-se também as repercussões sistémicas desta disfunção. Para tal, o grupo HFDMG foi sujeito às condições acima descritas (glicação e rápida expansão de tecido adiposo), através do tratamento com MG e da administração de uma dieta rica em triglicédeos. A utilização dos grupos HFD e MG, tratados apenas com dieta gorda e MG, respetivamente, permitiu distinguir as alterações que se deveram à interação da glicação com o tecido adiposo em rápida expansão (apenas evidenciáveis no grupo HFDMG), daquelas que poderiam resultar de um dos fatores individualmente.

Os ratos do grupo GK são provenientes de uma colónia selecionada de acordo com características fenotípicas de diabetes melitus tipo 2, incluindo insulino-resistência e hiperglicémia. Como tal, funcionam como um controlo positivo no que respeita a alterações associadas a diabetes tipo 2.

O único grupo com aumento de peso estatisticamente significativo foi o HFD. O mesmo se verificou neste grupo para a área média de adipócitos. No entanto, o grupo HFDMG foi tratado com a mesma dieta hipercalórica. Esta observação está em conformidade com o resto dos nossos resultados, e sugere que a glicação impede a expansão adequada do tecido adiposo, quando esta é solicitada face a um excessivo aporte calórico.

A positividade para o PAS e Tricrómio de Masson nos grupos tratados com MG (MG e HFDMG) era expectável. A coloração por PAS, que representa a acumulação de carboidratos e produtos inespecíficos da glicação, foi já associada à administração de MG (21). A fibrose causada pelo MG poderá dever-se a um processo mediado por TGF- β , de acordo com literatura já publicada (8, 22).

Para avaliar a irrigação do tecido adiposo subcutâneo, recorreu-se a uma técnica pioneira – ressonância magnética dinâmica *in vivo*. Comparámos a perfusão do tecido adiposo em relação ao tecido muscular, por forma a diminuir a variabilidade que resultaria de uma comparação de valores absolutos, devido às dimensões heterogéneas dos ratos. Constatámos que nos grupos tratados com MG, se verificou uma significativa diminuição da perfusão do tecido adiposo. Estes resultados são consistentes com publicações anteriores, em que, por análise histológica, após prévia injeção do produto de contraste *Evans Blue*, se demonstrou que a administração de MG se associava a uma diminuição de perfusão do tecido adiposo (8).

A hipóxia do tecido adiposo foi avaliada recorrendo a uma sonda de hipóxia específica, sendo estatisticamente significativa apenas no grupo HFDMG. Ou seja, não é taxativo que a diminuição da perfusão do tecido adiposo associado ao MG implique a sua hipóxia. De facto, o grupo MG não apresentou hipóxia estatisticamente significativa em relação ao controlo. Por outro lado, quando esta diminuição de irrigação induzida por MG se associou a uma rápida expansão do tecido adiposo induzida por dieta gorda, a hipóxia do mesmo foi evidenciável. A normalidade do grupo HFD prova que esta rápida expansão não é, por si só, suficiente para explicar a hipóxia verificada, provavelmente porque em condições fisiológicas os mecanismos de adaptação funcionam adequadamente. Num contexto de rápida proliferação e expansão, os adipócitos produzem um conjunto de citocinas capazes de estimular o crescimento angiogénico. Este crescimento vascular em consequência do crescimento do parênquima segue os princípios da vascularização oncogénica. Segundo este modelo, o crescimento rápido da massa tumoral condiciona zonas de hipóxia, que é detetada, entre outros mecanismos, pela inativação de proil-hidroxilases dependentes de oxigénio, que deixam de degradar proteoliticamente o HIF-1 α , permitindo a sua dimerização com o HIF-1 β para formar o fator de transcrição funcional HIF. Este fator

de transcrição associa-se a aumento de expressão de VEGF- α , que aumenta a expansão da vasculatura, aumentando o fluxo sanguíneo e diminuindo a hipóxia (23). Outra hipótese defende que o crescimento angiogénico seja desencadeado por sinais metabólicos de modo paralelo ou mesmo antecedendo a expansão do tecido adiposo. No entanto, as duas hipóteses não são mutuamente exclusivas (2). A propensão do tecido adiposo para a angiogénese, associada à abundância de fatores angiogénicos, células endoteliais, macrófagos e células progenitoras em circulação, contribuem para o seu elevado potencial expansivo (24).

A produção aumentada de VEGF- α e o aumento da vascularização permitem assim, em condições fisiológicas, a adaptação do tecido adiposo à sua rápida expansão num contexto de consumo excessivo de calorias. A sobre-expressão de VEGF- α no tecido adiposo de ratos transgênicos resulta num aumento da vascularização e diminuição da inflamação e resistência à insulina. Adicionalmente, a sobre-expressão de VEGF- α no tecido adiposo de animais obesos e insulino-resistentes foi capaz de reverter os defeitos metabólicos descritos. Por outro lado, a diminuição da expressão de VEGF, observada no tecido adiposo hipóxico, associa-se a maiores níveis de marcadores inflamatórios (25). Associado a este aumento de inflamação, verifica-se ainda o aumento da morte de adipócitos por apoptose e insulino-resistência. Previamente, o nosso grupo demonstrou que a administração de MG provocou diminuição de marcadores anti-apoptóticos e do ratio VEGF/ Ang2 (8). Para além do papel deletério na microvasculatura do tecido adiposo, a glicação também parece estar envolvida no comprometimento da sua capacidade de resposta a fatores de *stress*. Recentemente demonstrámos que o MG diminui a capacidade do tecido adiposo se adaptar à redução do fluxo sanguíneo induzido por cirurgia (9).

O aumento dos níveis de HIF-1 α , em resposta à hipóxia, associam-se a um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF-) e a proteína quimiotática dos monócitos (MCP-1), mediadores que têm sido associados ao aumento do risco para desenvolver síndrome metabólica, doenças

cardiovasculares e diabetes tipo 2 (26). A hipóxia, através da ativação de vias inflamatórias intracelulares, induz também fibrose no tecido adiposo, bloqueia a diferenciação de pré-adipócitos e diminui a captação de glicose pelos adipócitos (26, 27). Torna-se assim evidente que, embora uma alteração localizada, são expectáveis repercussões sistémicas associadas à hipóxia do tecido adiposo. No nosso modelo experimental, as alterações sistémicas foram avaliadas através da quantificação das formas total e fosforilada do recetor da insulina, da determinação da concentração sérica de ácidos gordos livres, glicose no jejum, trigliceridémia e da realização de um teste de tolerância intraperitoneal à glicose.

Demonstrámos uma diminuição da expressão da forma fosforilada do recetor da insulina a nível do tecido adiposo subcutâneo nos grupos HFDMG e GK, sem alterações da expressão da forma total do recetor. Os mesmos grupos, HFDMG e GK, apresentaram aumento da concentração sérica de ácidos gordos livres e diminuição da tolerância à glicose. Como já referimos, o grupo GK funciona, relativamente a alterações metabólicas associadas a diabetes tipo 2, como um controlo positivo. O grupo HFDMG é assim o único grupo que apresenta uma desregulação metabólica semelhante à que se verifica em ratos diabéticos. Esta observação é compatível com os efeitos deletérios da hipóxia do tecido adiposo no metabolismo energético, já que o grupo HFDMG foi também o único a apresentar hipóxia estatisticamente significativa. A coesão dos nossos resultados reforça a nossa hipótese. Embora grupo HFD também tenha apresentado diminuição da tolerância à glicose, esta não foi tão marcada como nos grupos previamente destacados.

Assim, se por um lado a estimulação da angiogénese do tecido adiposo num contexto de resposta a hipóxia, comum no tecido adiposo na obesidade, pode melhorar os efeitos sistémicos associados à sua disfunção, uma angiogénese ineficaz terá um efeito oposto (27, 28).

CONCLUSÃO

A glicação induzida por MG, associada a uma rápida expansão do tecido adiposo, associa-se à sua disfunção vascular e hipóxia. A hipóxia do tecido adiposo, embora teoricamente um processo localizado, tem repercussões sistêmicas a nível metabólico características da diabetes tipo 2, incluindo insulino-resistência e intolerância à glicose.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Paulo Matafome, pela orientação, pela capacidade de trabalho e liderança, pela disponibilidade e inspiração.

À Professora Doutora Raquel Seça, pela orientação, pelos conhecimentos partilhados, pela coordenação e liderança da equipa, pela vocação pedagógica que se reflete diariamente nos ensinamentos e na crítica construtiva, e pela amizade.

Ao Mestre Tiago Rodrigues, pela ajuda sempre disponível quando necessária, pelo “*know how*” partilhado no laboratório, e pela capacidade de comunicar ciência em cada explicação.

Aos colegas de bancada, futuros colegas de profissão e amigos Christian Neves e Luís Gamas, pelos momentos bem passados no laboratório e pela disponibilidade e entreaajuda que sempre tivemos.

BIBLIOGRAFIA

1. GH. Goossens, The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & Behavior*. **94** (2), 206-18 (2008).
2. S. Corvera, O. Gealekman, Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1842** (3), 463-72 (2014).
3. CH. Cho, YJ. Koh *et al.*, Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circulation Research*. **100**, e47-e57 (2007).
4. ME. Rausch, S. Weisberg, P. Vardhana, DV. Tortoriello, Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *International Journal of Obesity*. **32** (3), 451–463 (2008).
5. N. Hosogai, A. Fukuhara *et al.*, Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. **56** (4), 901–911 (2007).
6. M. Pasarica, OR. Sereda *et al.*, Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. **58** (3), 718–725 (2009).
7. GH. Goossens, A. Bizzarri *et al.*, Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation*. **124** (1), 67-76 (2011).
8. P. Matafome, R. Seïça *et al.*, Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry*. **118** (2), 58–68 (2012).
9. T. Rodrigues, P. Matafome, R. Seïça, Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. *Archives of Physiology and Biochemistry*. **119** (5), 209-18 (2013).

10. A. Berner, O. Brouwers *et al.*, Protection against methylglyoxal-derived AGEs by regulation of glyoxalase 1 prevents retinal neuroglial and vasodegenerative pathology. *Diabetologia*. **55** (3), 845–54 (2012).
11. J. Kim, JS. Kim, *et al.*, Accumulation of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end product, increases apoptosis of lens epithelial cells both in vitro and in vivo. *Experimental & Molecular Medicine*. **44** (2), 167–75 (2012).
12. C. Sena, P. Matafome *et al.*, Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmaceutical Research*. **65** (5), 497–506 (2012).
13. World Diabetes Day 2014. World Health Organization, Web. (2014).
14. V. Kumar, AK. Abbas, N. Fausto, JC. Aster, JA. Perkins, Ed. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. (Saunders Elsevier, Philadelphia, ed. 8, 2010)
15. S. Melmed, RH. Williams, Ed. *Williams Textbook of Endocrinology*. (Saunders Elsevier, Philadelphia, ed. 12, 2011)
16. GM. Reaven, Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiology Review*. **75** (3), 473-86 (1995).
17. DW. Haslam, WP. James, Obesity. *Lancet*. **366** (9492), 1197-209 (2005).
18. P. Matafome, T. Rodrigues, R. Seïça, Glycation and hypoxia: two key factors for adipose tissue dysfunction. *Current Medical Chemistry*. **22**, 1-21 (2015).
19. A. Goldin, J. Beckman, AM. Schmidt, M. Creager, Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. **114** (6), 597-605 (2006).
20. A. Negre-Salvayre, R. Salvayre, N. Augé, R. Pamplona, M. Portero-Otín, Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & Redox Signaling*. **11** (12). 3071-109 (2009).
21. T. Rodrigues, P. Matafome, D. Santos-silva, C. Sena, R. Seïça, Reduction of methylglyoxal-induced glycation by pyridoxamine improves adipose tissue microvascular lesions. *Journal of Diabetes Research*. 2013:690650, Epub (2013)

22. A. Yuen, C. Laschinger, *et al.*, Methylglyoxal-modified collagen promotes myofibroblast differentiation. *Matrix Biology*, **29** (6), 537–548 (2010).
23. P. Carmeliet, R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. **473** (7347), 298-307 (2011).
24. JY. Kim, E. van de Wall, *et al.*, Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*. **117** (9), 2621-2637(2007)
25. H.K. Sung, K.O. Doh, *et al.*, Adipose vascular endothelial growth factor regulates metabolic homeostasis through angiogenesis. *Cell Metabolism*. **17** (1), 61–72 (2013).
26. N. Halberg, I. Wernstedt-asterholm, PE. Scherer, The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. **37** (3), 753-68, x-xi (2008).
27. P. Trayhurn, B. Wang, IS. Wood, Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *The British Journal of Nutrition*. **100** (2), 227-235 (2008).
28. S. Landskroner-Eiger, B. Qian *et al.*, Proangiogenic contribution of adiponectin towards mammary tumor growth in vivo. *Clinical Cancer Research*. **15** (10), 3265-3276 (2009).

ANEXO

O presente documento foi elaborado de acordo com as normas editoriais da revista *Science*. Estas normas encontram-se disponíveis para consulta *online* na secção de informação para autores do site oficial da revista, através do endereço electrónico: <http://www.sciencemag.org/site/feature/contribinfo/index.xhtml>