

Ana Sofia Chasqueira dos Santos

Alteração da sinalização dopaminérgica por desnervação do corpo carotídeo na modulação da função do tecido adiposo na Síndrome Metabólica

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Orientada pelo Professor Doutor Paulo Matafome e coorientada pela Professora Doutora Anabela Rolo

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Alteração da sinalização dopaminérgica por desnervação do corpo carotídeo na modulação da função do tecido adiposo na Síndrome Metabólica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Paulo Matafome do Laboratório de Fisiologia, do Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida (IBILI), da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e coorientação da Professora Doutora Anabela Rolo do Departamento Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Ana Sofia Chasqueira dos Santos

Setembro 2017

*“Sabemos muito mais do que julgamos,
podemos muito mais do que imaginamos.”*

José Saramago

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos, sem os quais não se teria tornado realidade, os quais não posso deixar de agradecer.

Ao Professor Doutor Paulo Matafome, pela sua orientação, disponibilidade, apoio, pela constante partilha do saber, opiniões e críticas assim como a sua total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho. Pela confiança que se foi adquirindo ao longo de mais de um ano de trabalho, pelos conselhos, motivação, palavras de incentivo, autonomia e muita paciência, que me permitiram crescer a nível profissional e pessoal.

Gostaria de exprimir a minha gratidão à Professora Doutra Raquel Seiça pela oportunidade de pertencer ao seu grupo de investigação, pelo carinho com que me recebeu, disponibilidade e confiança dado desde o primeiro dia de trabalho.

À minha coorientadora Professora Doutora Anabela Rolo, pertencente ao DCV da FCTUC, pela sua orientação, disponibilidade e apoio para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Sílvia Conde, à Joana Sacramento e à Bernardete Melo do CEDOC da FCM-UNL, pela parceria e especial contributo neste trabalho, principalmente na realização dos procedimentos cirúrgicos no nosso modelo animal, que apesar dos muitos contratempus acabou por tudo correr bem.

Aos muitos colegas e amigos do laboratório de Fisiologia, que ao longo deste último ano tive o prazer conhecer, partilhar bons momentos, alegrias, brincadeiras e principalmente conquistas. Obrigada por todos os momentos passados, palavras de incentivo e preocupação, foi um prazer trabalhar com cada um de vós. Em especial, quero agradecer ao Tiago Rodrigues e à Patrícia Gasparini, as palavras de apoio, incentivo e por toda a ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da Covilhã, em especial ao Ricardo Valentim, Ana Madaleno, Carolina e ao meu querido Abel, que apesar dos 200Km que nos separavam durante a semana, sempre tiveram uma palavra amiga, de conforto e ajuda. Obrigada por tudo o que têm feito por mim, por me ouvirem nos momentos menos bons, pelo carinho e amizade que tem demonstrado ao longo destes últimos anos.

Quem disse: “Os amigos da universidade são para a vida”, não se enganou! Às minha queridas amigas da universidade, especialmente, Sara Malaca, Liliana Fernandes e Inês Neves, que mesmo longe a amizade nunca esmoreceu. Obrigada por todos os momentos de diversão, brincadeiras, gargalhadas sem fim, companheirismo e de partilha, com vocês foi tudo muito mais fácil e quatro anos souberam a pouco! Acredito sinceramente que haja ainda muitas aventuras pela frente. À Inês Neve, fiel companheira de mestrado e irmã que nunca tive, obrigada por tudo! Sei que não foi fácil estes últimos dois anos, tivemos momentos bons e outros menos bons, com histórias que nunca vou esquecer. Obrigada pela palavra certa na hora certa, pelos conselhos, apoio, boa disposição, por me ouvires todas as noites. Isto sim é uma verdadeira amizade!

À minha enorme e maravilhosa família, tanto paterna como materna, que apesar de muitos não saberem bem o que faço, têm sempre uma palavra de apoio, incentivo e preocupação.

Por último, e mais importante, quero agradecer em especial à minha tia madrinha Ana Maria, à minha avó Maria, ao meu pai e à minha mãe, que sempre tiveram presentes nos momentos bons e menos bons, que sempre me apoiaram e incentivaram, pelas palavras de conforto, por todo o amor e paciência que têm tido ao longa da minha vida. Graças a vocês tenho realizado muitos dos meus sonhos e em breve realizo mais um. Sem vocês nada isto era possível e acreditem que esta vitória é minha, mas também é vossa!

Índice

Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	XI
Lista de abreviaturas	XII
Resumo	XV
Palavras-chave	XVI
Abstract.....	XVII
Keywords.....	XVIII
Capítulo 1. Introdução	2
1.1. “A Obesidade e Síndrome Metabólica aumentam o risco de desenvolvimento da Diabetes <i>Mellitus</i> tipo II”	2
1.2. Tecido Adiposo - órgão regulador do metabolismo e da inflamação.....	7
1.2.1. Tecido adiposo castanho.....	7
1.2.1.1. Caracterização, metabolismo e localização	7
1.2.2. Tecido adiposo branco.....	9
1.2.2.1. Localização e caracterização	9
1.2.2.2. Metabolismo	9
Papel da sinalização da insulina	10
PPAR- γ na regulação metabolismo	12
AMPK enzima modeladora de vários processos metabólicos.....	13
1.2.2.3. Regulação endócrina.....	15

1.2.2.4. Desregulação do metabolismo.....	17
Hipertrofia dos adipócitos	17
O culminar dos mecanismos de “lipotoxicidade” no adipócito.....	18
1.3. ”Sistema nervoso autónomo e os seus neurotransmissores desempenham um papel importante na regulação do tecido adiposo”	21
1.3.1. As catecolaminas	21
1.3.1.1. Mecanismos de ação no tecido adiposo.....	23
1.3.2. Catecolaminas: Dopamina.....	24
1.3.2.1. Mecanismos de ação	25
1.4. “Corpo carotídeo responsável pela produção de dopamina periférica”	27
1.4.1. Caracterização e mecanismos de ação.....	27
1.4.2. Sensor metabólico	28
1.4.3. Desnervação do corpo carotídeo.....	30
Capítulo 2. Objetivos.....	32
Capítulo 3. Materiais e Métodos	34
3.1. Modelo animal.....	34
3.2. Procedimentos cirúrgicos	37
3.2.1. Cirurgia de remoção do corpo carotídeo e cirurgia <i>sham</i>	37
3.3. Análise sistémica <i>in vivo</i>	38
3.3.1. Monitorização do peso e da ração	38
3.3.2. Colheita de sangue e recolha de tecidos	38
3.3.3. Provas de tolerância à insulina	39

3.3.5. Níveis plasmáticos de insulina	40
3.3.6. Índice de insulino-resistência – HOMA	40
3.3.7. Níveis plasmáticos de glucagina.....	40
3.4. Análises bioquímicas.....	41
3.4.1. Reagentes utilizados	41
3.4.2. Análise do TAE por <i>Western Blotting</i>	41
3.4.2.1. Preparação das amostras.....	41
3.4.2.2. Eletroforese vertical (SDS-PAGE).....	42
3.4.2.3. Transferência para membrana de PVDF (Flureto de Polivinilideno)....	42
3.4.2.4. Incubação e marcação com os anticorpos específicos.....	43
3.4.2.5. Revelação das membranas.....	44
3.5. Análise estatística	46
Capítulo 4. Resultados.....	48
4.1. Monotorização do peso e da ração	48
4.2. Sensibilidade à insulina	52
4.2.1. Glicemia em jejum, insulinemia, HOMA e níveis plasmáticos de glucagina	52
4.2.2. Prova de tolerância à insulina.....	56
4.2.3. Sinalização da insulina no TAE.....	58
4.3. Avaliação do metabolismo lipídico	60
4.3.1. Níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol.....	60

4.3.2. Mecanismos de oxidação, síntese e armazenamento de ácidos gordos no TAE	62
Análise da AMPK na sua forma total e fosforilada (AMPK-Thr172), da ACC na sua forma total e fosforilada (ACC-Ser79) e FAS na sua forma total	62
Análise do PGC-1 α e da UCP-1 ambos na sua forma total	64
Análise do PPAR- γ na sua forma total	64
4.4. Sinalização dopaminérgica e adrenérgica no TAE.....	66
Capítulo 5. Discussão	69
Capítulo 6. Conclusões	78
Capítulo 7. Referências Bibliográficas	80

Lista de figuras

Figura 1 - Conjunto de distúrbios metabólicos que caracterizam o desenvolvimento da SM. Desenvolvimento da resistência à insulina nos tecidos insulino-dependentes pela ação das doenças, obesidade, SM e principalmente DMTII.....	5
Figura 2 - Metabolismo do tecido adiposo castanho.....	8
Figura 3 - Via de sinalização do recetor de insulina para a absorção da glicose extracelular.	12
Figura 4 - Fisiologia e as várias funções metabólicas que ocorrem no tecido adiposo branco.	15
Figura 5 - As adipocinas e as suas principais funções.....	16
Figura 6 - Mecanismo de inflamação crónica de baixo grau, que ocorre no tecido adiposo branco, na obesidade e conseqüentemente na DMTII, com ativação de mecanismos que levam à resistência à insulina, lipólise e inibição do PPAR- γ	20
Figura 7 - Síntese das catecolaminas.....	22
Figura 8 - Vias de sinalização adrenérgica envolvidas na ativação e inibição da lipólise; Via de sinalização do recetor de insulina na inibição da lipólise, ambas as vias no tecido adiposo.....	24
Figura 9 - Via de sinalização dos recetores dopaminérgicos D1 e D2.	26
Figura 10 - Esquema temporal ilustrativo do trabalho experimental, exibindo os cinco grupos de ratos utilizados, dietas envolvidas e conseqüentes cirurgias efetuadas à 20 ^a semana de vida.....	36
Figura 11 - A. Glicemia após jejum de 6 horas, B. Insulinemia, C. Índice de insulino-resistência-HOMA e D. Níveis plasmáticos de glucagina, todos os parâmetros foram medidos antes do sacrifício.	55

Figura 12 - A. Área debaixo da curva (<i>Area Under the Curve</i> – AUC) e B. Glicemia após 2 horas da administração de insulina, PTI, antes do sacrifício.	57
Figura 13 - A. Análise por <i>Western Blotting</i> do IR na forma total e do IR na sua forma fosforilada (IR-Tyr1361) e B. Análise por <i>Western Blotting</i> do transportador de glucose tipo 4 na sua forma total (GLUT-4).	59
Figura 14 - A. Níveis plasmáticos de triglicerídeos e B. Níveis plasmáticos de colesterol, antes do sacrifício.....	61
Figura 15 - A. Análise por <i>Western Blotting</i> da AMPK na forma total e da AMPK na forma fosforilada (AMPK-Thr172), B. Análise por <i>Western Blotting</i> da ACC na forma total e da ACC forma fosforilada (ACC-Ser79) e C. Análise por <i>Western Blotting</i> da FAS na forma total.	63
Figura 16 - A. Análise por <i>Western Blotting</i> da PGC-1 α na forma total, B. Análise por <i>Western Blotting</i> da UCP-1 na forma total e C. Análise por <i>Western Blotting</i> do PPAR- γ na forma total.	65
Figura 17 - A. Análise por <i>Western Blotting</i> do D1R na forma total, B. Análise por <i>Western Blotting</i> do D2R na forma total e C. Análise por <i>Western Blotting</i> do β 3-AR na sua forma total.	67

Lista de tabelas

Tabela 1 - Constituição das diversas soluções utilizadas em *Western Blotting*. 45

Tabela 2 - Ração ingerida, ingestão calórica e percentagem do ganho de peso entre a 20^a-23^a semana de vida nos diferentes grupos; Peso corporal e peso do TAE, em jejum noturno, antes do sacrifício..... 51

Lista de abreviaturas

- AADC: Descarboxilase do L-aminoácido aromático;
- α_2 -AR: Recetores α_2 -adrenérgicos;
- AC: Adenilato ciclase;
- ACC: Acetil-CoA carboxilase;
- AGLs: Ácidos gordos livres;
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclica;
- AMPK: Proteína cinase ativada por AMP;
- AMP: Adenosina monofosfato;
- AR: Recetores adrenérgicos;
- ATP: Adenosina Trifosfato;
- AUC: *Area Under the Curve*;
- β -AR: Recetor β -adrenérgico;
- D β H: Dopamina- β -hidroxilase;
- DMTII: Diabetes *Mellitus* tipo II;
- Dn: Cirurgia de desnervação do corpo carotídeo;
- DR: Recetor dopaminérgico.
- FAS: Ácido gordo sintase;
- FATP: Proteína específica de transporte;
- GK: *Goto-Kakizaki*;
- GLUT-4: Transportador de glucose tipo 4;
- HDL: Lipoproteínas de alta densidade;
- HFD: *High fat diet*;
- HOMA: *Homeostatic model assessment*;

- HSL: Lipase hormono-sensitiva;
- IKK β : Inibidor cinase do fator nuclear kappa- β ;
- IL-6: Interleucina-6;
- IMC: Índice de massa corporal;
- I.p.: Injeção intraperitoneal;
- IR: Recetor de insulina;
- IRS: Substrato do recetor de insulina;
- JNK: Cinases do N-terminal Jun;
- LDL: Lipoproteínas de baixa densidade;
- L-DOPA: 1-3,4-diidroxifenilalanina;
- LPL: Lipoproteína lípase;
- MCP-1: Proteína quimioatratora de monócitos;
- MMP: Metaloproteínases;
- NF-kB: Factor nuclear kappa B;
- OMS: Organização Mundial de Saúde;
- PAI-1: Inibidor de plasminogénio;
- PerA: Perilipina A
- PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinase;
- PKA: Proteína cinase A;
- PKB: Proteína cinase B, conhecida como AKT;
- PKC: Proteína cinase C;
- PPAR- γ : *Peroxisome-proliferato-activated receptor- γ* ;
- PTI: Prova de tolerância à insulina;
- SD: *Standard diet*;
- Sh: Cirurgia *Sham*;

- SM: Síndrome Metabólica;
- SNA: Sistema nervoso autónomo;
- SNS: Sistema Nervoso Simpático;
- TAE: Tecido adiposo epididimal;
- TLR: Recetores de membrana *Toll-like*;
- TNF- α : Fator de necrose tumoral- α ;
- TH: Tirosina hidroxilase;
- TZD: Tiazolidinedionas;
- W: *Wistar*;
- UCP-1: Proteína desacopladora-1;
- VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

Resumo

Introdução e objetivos: A Síndrome metabólica (SM) é caracterizada pelo desenvolvimento de um conjunto de distúrbios metabólicos, podendo desencadear doenças como a obesidade e diabetes *Mellitus* tipo II (DMTII). O corpo carotídeo é um órgão quimiorrecetor, que tem como função detetar alterações no sangue arterial, sendo recentemente implicado como um potencial “glicosensor” e onde a insulina atua de forma preponderante na resposta a baixas contrações de glicemia. Numa situação de hiperinsulinemia, como se verifica na DMTII, há resistência à insulina periférica nos órgãos sensíveis à sua ação, como no tecido adiposo e desta forma, no corpo carotídeo. No entanto, com a resseção bilateral crónica do nervo do seio carotídeo esta situação parece ser revertida. Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar as alterações da sinalização dopaminérgica por desnervação do corpo carotídeo na sensibilidade à insulina, armazenamento e metabolismo lipídico no tecido adiposo e perfil glicémico em ratos diabéticos e hiperlipidémicos.

Métodos: Foram utilizados ratos *Wistar*, alimentados com dieta normal (W_SD), e ratos *Goto-kakizaki* (GK), ratos diabéticos tipo II não hiperlipidémicos, que foram divididos em 4 grupos distintos: GK mantidos com dieta normal (GK_SD); GK hiperlipidémicos, pela indução de uma dieta modificada, rica em gordura e sacarose, (GK_HFD); GK hiperlipidémicos, pela indução de uma dieta modificada, rica em gordura e sacarose, sujeitos à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo às 20 semanas de vida (GK_HFD_Dn); e GK hiperlipidémicos, pela indução de uma dieta modificada, rica em gordura e sacarose, sujeitos à cirurgia *sham* às 20 semanas de vida (GK_HFD_Sh) (n=5-10/grupo). Foram avaliados em jejum, antes do sacrifício, os níveis plasmáticos de glicose, lípidos, insulina e glucagina, avaliada a tolerância à insulina e o índice de insulino-resistência (HOMA), bem como os mecanismos

associados à captação e utilização da glicose, de oxidação, síntese e armazenamento de ácidos gordos e de sinalização adrenérgica e dopaminérgica no tecido adiposo epididimal (TAE) por *Western Blotting*.

Resultados: A dieta modificada, enriquecida em gordura e sacarose, levou a um agravamento da resistência à insulina, assim como a um aumento dos níveis plasmáticos da glicose, triglicerídeos e colesterol, em jejum, em relação ao grupo GK_SD. No grupo sujeito à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo observou-se uma diminuição da ração ingerida e da ingestão calórica associada, da percentagem de ganho de peso, entre a cirurgia e o sacrifício, concordante com a diminuição dos níveis plasmáticos da glicose, triglicerídeos e colesterol, assim como da melhoria da sensibilidade à insulina. No TAE, houve um aumento dos níveis de AMPK-Thr172, responsável pelo aumento da oxidação lípica, e da expressão de recetores dopaminérgicos D1.

Conclusão: Estes resultados sugerem que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo levou uma melhoria do perfil glicémico e da resistência à insulina periférica, na DMTII, levando a um aumento de mecanismos de oxidação de ácidos gordos e da sinalização dopaminérgica no TAE, podendo constituir uma técnica inovadora no combate às doenças metabólicas.

Palavras-chave: Síndrome Metabólica, resistência à insulina, tecido adiposo, dopamina periférica, desnervação do corpo carotídeo.

Abstract

Introduction and objectives: Metabolic Syndrome (MS) is characterized by the development a set of metabolic disorders, which can trigger diseases such as obesity and type II diabetes mellitus (TIIDM). The carotid body is a chemoreceptor organ, which function is to detect alterations in the arterial blood, being recently implicated as a potential "glucosensor" and where insulin acts preponderantly in the response to low blood glucose contractions. In a situation of hyperinsulinemia, as it happens in the TIIDM, there is resistance to the peripheral insulin in the sensitive organs to its action as in the adipose tissue and, in this way, in the carotid body. However, with chronic carotid sinus nerve bilateral resections of the carotid body, this situation is reversed. In this way, this work aims to evaluate the alterations of dopaminergic signaling by denervation of the carotid body in insulin sensitivity, storage and lipid metabolism in adipose tissue and glycemic profile in diabetic and hyperlipidemic rats.

Methods: Wistar rats fed normal diet (W_SD) and Goto-kakizaki (GK) non-hyperlipidemic type II diabetic rats, were divided into four distinct groups: GK maintained on normal diet (GK_SD); GK hyperlipidemic, by the induction of a modified diet, rich in fat and sucrose, (GK_HFD); GK hyperlipidemic, by the induction of a modified diet, rich in fat and sucrose, subjected to carotid body denervation surgery at 20 weeks of age (GK_HFD_Dn); And hyperlipidemic GK, by induction of a modified diet, high in fat and sucrose, subject to *sham* surgery at 20 weeks of age (GK_HFD_Sh) (n=5-10/group). Glucose, lipid, insulin and glucagon levels were evaluated before fasting, insulin tolerance and insulin resistance index (HOMA) were evaluated, as well as the mechanisms associated with the uptake and utilization of

glucose, oxidation, synthesis and storage of fatty acids and adrenergic and dopaminergic signaling in epididymal adipose tissue (EAT) by Western blotting.

Results: The modified diet, enriched in fat and sucrose, led to a worsening of insulin resistance, as well as an increase of fasting levels of glycemia, triglycerides and cholesterol, in relation to the GK_SD group. In the group of carotid body denervation, a decrease in ingested ration and associated caloric intake, the percentage of weight gain between surgery and sacrifice, was observed, in agreement with the decrease in plasma levels of glycemia, triglycerides and cholesterol, as well as improving insulin sensitivity. In EAT, increased levels of AMPK-Thr172, responsible for the increase of lipid oxidation, and expression of dopaminergic D1 receptors were observed.

Conclusions: These results suggest that the carotid body denervation surgery led to an improvement in the glycemic profile and peripheral insulin resistance, in the T1DM, leading to an increase of fatty acid oxidation mechanisms and dopaminergic signaling in TAE, being an innovative technique against metabolic diseases.

Keywords: Metabolic Syndrome, insulin resistance, adipose tissue, peripheral dopamine, carotid body denervation.

CAPÍTULO 1

Introdução

Capítulo 1. Introdução

1.1. “A Obesidade e Síndrome Metabólica aumentam o risco de desenvolvimento da Diabetes *Mellitus* tipo II”

No decorrer das últimas décadas, o aumento do poder económico e as várias mudanças do estilo de vida permitiram a abundância de alimentos ricos em calorias (Caruso et al., 2010). O seu consumo excessivo, em conjunto com a diminuição da atividade física, leva à progressiva acumulação de gordura corporal, em relação à massa magra (Guilherme et al., 2008). Estes fatores contribuem, desta forma, para a morbilidade e mortalidade da obesidade, que tem vindo a aumentar dramaticamente em quase todas as sociedades do mundo, principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, particularmente nos Estados Unidos da América, Europa e Médio Oriente (Caruso et al., 2010; Guilherme et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define excesso de peso como índice de massa corporal (IMC) superior ou igual a 25kg/m^2 , obesidade como IMC superior ou igual a 30kg/m^2 , e estima que atualmente haja 2 mil milhões de adultos em todo mundo que sofram de obesidade ou tenham excesso de peso (Martin et al., 2015; Matafome et al., 2012). De igual modo, tem-se verificado um aumento da prevalência desta condição nas camadas mais jovens das populações, acarretando um enorme risco de prevalência da doença na idade adulta, podendo aumentar ainda mais estes números (Heindel et al., 2015).

A obesidade é uma doença caracterizada pelo excessivo aporte calórico e um desequilíbrio entre consumo e dispêndio de energia, levando uma situação de *stress* celular, prejudicando deste modo a homeostasia metabólica (Caruso et al., 2010). Este processo pode constituir um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, alguns tipos de cancro, doença do fígado gordo não alcoólico e o desenvolvimento da resistência à insulina, podendo progredir para uma situação e diabetes *Mellitus* tipo II (DMTII) (Caruso et al., 2010; Dalamaga, 2014; Guilherme et al., 2008; Rutkowski et al., 2009). Para além disso, esta doença também desempenha um papel importante na caracterização da síndrome metabólica (SM) (Figura 1) (Martin et al., 2015).

A SM é uma doença multifatorial caracterizada pelo desenvolvimento de um conjunto de distúrbios metabólicos, sendo considerada quando, pelo menos, três destes estão manifestados (Smith & Ryckman, 2015). Estes incluem obesidade abdominal; hiperlipidemia, com triglicéridos elevados, diminuição da concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e consequente aumento da concentração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL); hipertensão; hiperglicemia (intolerância à glicose) e hiperinsulinemia (resistência à insulina) (Figura 1) (Azhar, 2010; Grundy, 2015; Lopez-candales et al., 2017; Smith & Ryckman, 2015; Tellechea et al., 2017).

A prevalência deste distúrbio está a aumentar devido, em grande parte, ao aumento da obesidade, causada pela dieta e o estilo de vida sedentário (Smith & Ryckman, 2015). Estima-se que a prevalência a nível mundial varie entre 20% a 40%, dependendo da região, sexo, idade, raça e etnia. No entanto, pensa-se que cerca de um quarto (25%) da população adulta mundial, satisfaça os critérios clínicos associados à SM (Grundy, 2015; Lopez-candales et al., 2017). É importante referir que estes indivíduos têm um risco duas vezes mais elevado de desenvolver doenças

cardiovasculares e cinco vezes de desenvolver DMTII, num período de 5 a 10 anos (Azhar, 2010; Grundy, 2015; Lopez-candales et al., 2017).

A diabetes é uma doença metabólica, na qual 90-95% da predominância é do tipo II (American Diabetes Association, 2014). Desta forma, a DMTII é uma das doenças mais ameaçadoras do século XXI, sendo que os dados estatísticos mostram que a sua incidência está a aumentar globalmente e de forma preocupante (Golay & Ybarra, 2005). Estima-se que a prevalência a nível mundial seja de 415 milhões de adultos, e que mais 318 milhões possuam tolerância diminuída à glicose, tendo elevado risco de desenvolver DMTII no futuro (Zang et al., 2017). Pensa-se que esses números cheguem perto dos 600 milhões de adultos em 2035, sendo perceptível que esta doença seja a quinta principal causa de morte em todo o mundo (Messina et al., 2017).

A DMTII é poligénica, complexa e heterogénea, sendo uma doença silenciosa e progressiva, uma vez que durante um longo período de tempo a hiperglicemia desenvolve-se gradualmente e não há manifestação de quaisquer sintomas clínicos (American Diabetes Association, 2014; Guelho et al., 2013). A principal causa da DMTII é uma inadequada resposta secretora de insulina, causada pela disfunção das células- β pancreáticas, sendo incapazes de segregar os níveis exigidos de insulina para compensar a resistência dos tecidos insulino-dependentes, como o tecido adiposo, fígado e músculo-esquelético. Esta resistência resulta na diminuição das respostas metabólicas destes órgãos periféricos à ação da insulina (Figura 1) (American Diabetes Association, 2014; Boada et al., 2013; Guilherme et al., 2008; Kusminski et al., 2016; Zang et al., 2017). O desenvolvimento da doença surge por uma compensação inicial da insulino-resistência, levando ao aumento da produção e secreção de insulina, nas células- β do pâncreas. No entanto, com o decorrer do tempo, este mecanismo compensatório falha, por falência funcional e estrutural destas células, levando à

diminuição da secreção desta hormona. Estes mecanismos resultam num aumento dos ácidos gordos livres (AGLs), da glicemia e da resistência periférica à insulina, contribuindo para o desencadear de mecanismos de “glico” e “lipotoxicidade” (Boada et al., 2013; Guelho et al., 2013; Poitout & Robertson, 2008; Weir & Bonner-Weir, 2004; Weyer et al., 1999).

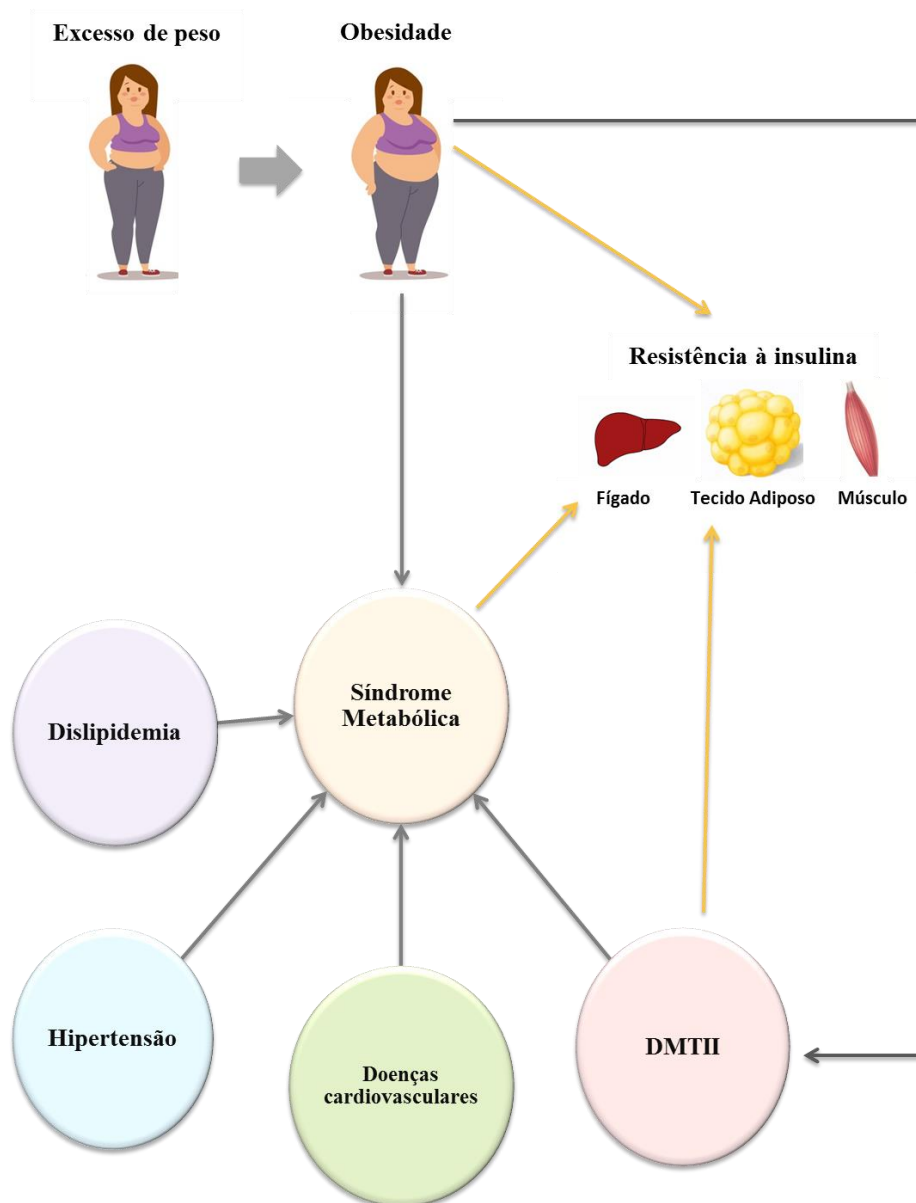


Figura 1 - Conjunto de distúrbios metabólicos que caracterizam o desenvolvimento da SM. Desenvolvimento da resistência à insulina nos tecidos insulino-dependentes pela ação das doenças, obesidade, SM e principalmente DMTII.

Abreviaturas: SM: Síndrome Metabólica e DMTII: Diabetes *Mellitus* tipo II.

A prevalência da DMTII varia consoante os diferentes grupos raciais/étnicos, sendo fortemente associada a uma predisposição genética e fatores ambientais. A suscetibilidade a esta doença também aumenta com o aumento da idade, excesso de peso, provocada pela falta de atividade física, obesidade, obesidade durante a infância e/ou adolescência, resistência à insulina, SM, hipertensão, dislipidemia ou em mulheres com diabetes *Mellitus* gestacionais (American Diabetes Association, 2014; Kong et al., 2016). As complicações a longo prazo podem incluir retinopatia com potencial perda de visão, nefropatia, levando à insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de úlceras do pé, com consequentes amputações, e sintomas gastrointestinais (American Diabetes Association, 2014).

As modificações do estilo de vida e dos hábitos alimentares, assim como a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à resistência à insulina, podem ser eficazes no tratamento e prevenção da DMTII. Recentemente, o tecido adiposo tornou-se num potencial alvo terapêutico, uma vez que é um órgão multifatorial, que desempenha funções metabólicas conhecidas e que, numa situação de disfunção, como acontece na DMTII, desenvolve um mecanismo de lipotoxicidade. Sendo este mecanismo responsável por alterar as vias de sinalização da insulina, ocorrendo resistência progressiva à mesma neste órgão (Guilherme et al., 2008; Kusminski et al., 2016). Deste modo, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na disfunção do tecido adiposo poderá ser uma oportunidade para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção destas doenças.

1.2. Tecido Adiposo - órgão regulador do metabolismo e da inflamação

O tecido adiposo é essencial para a vida dos mamíferos, sendo a principal fonte de ácidos gordos num período de jejum para uso de energia e produção de calor. Existem dois tipos de tecido adiposo presentes nos mamíferos: branco e castanho. É de salientar que ambos têm composição, funções e localização diferentes (Caruso et al., 2010; Gesta et al., 2007).

1.2.1. Tecido adiposo castanho

1.2.1.1. Caracterização, metabolismo e localização

O tecido adiposo castanho é responsável, em muitos seres vivos homeotérmicos, como por exemplo, os mamíferos, pela adaptação ao clima frio, sendo a sua principal função a termogénese, ou seja, a produção de calor (Caruso et al., 2010; Guilherme et al., 2008). Sendo também responsável, maioria dos mamíferos, pelo calor gerado durante a febre, estado de excitação e hibernação (Caruso et al., 2010).

Em comparação ao tecido adiposo branco, o tecido adiposo castanho apresenta maior número de gotas de triglicéridos por adipócito, sendo estas mais acessíveis à hidrólise e posteriormente oxidação mais rápida dos AGLs (Caruso et al., 2010; Guilherme et al., 2008). Tal facto é devido a uma maior abundância de mitocôndrias neste tecido (responsáveis pela cor castanhada do tecido) e da presença de uma proteína desacopladora-1 (UCP-1) (Caruso et al., 2010; Guilherme et al., 2008). Esta proteína

está presente na cadeia transportadora de elétrons, sendo expressa na membrana interna da mitocôndria, o que permite a utilização da energia derivada da β -oxidação, através da fosforilação não-oxidativa, para produção de calor. Este fenômeno ocorre porque estes adipócitos apresentam uma vasculatura mais rica, respondendo mais rapidamente à estimulação do sistema nervoso simpático (SNS) (Figura 2).

Recentemente foram encontrados no organismo do ser humano, depósitos de adipócitos castanhos, na zona cervical, supraclavicular e na região das axilas. Desconhecia-se, até então, a existência deste tecido no ser humano adulto, pois pensava-se que desaparecia no primeiro ano de vida (Caruso et al., 2010; Guilherme et al., 2008; Nedergaard et al., 2007).

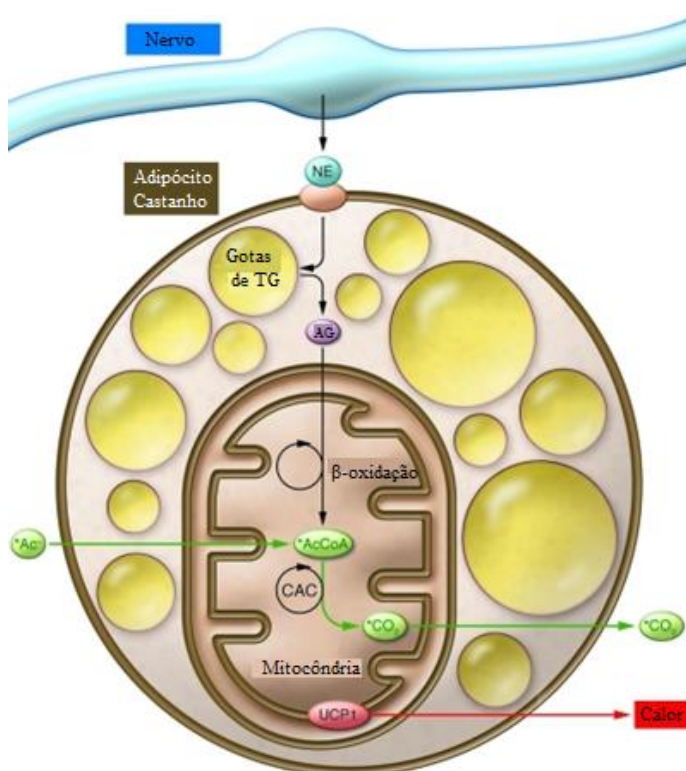


Figura 2 - Metabolismo do tecido adiposo castanho.

Abreviaturas: NE: Noradrenalina ou Norepinefrina; TG: Triglicerídeos; AG: Ácidos gordos; AcCoA: Acetil-CoA; CAC: Ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs e UCP-1: Proteína desacopladora-1 (adaptado de Cannon et al., 2012).

1.2.2. Tecido adiposo branco

1.2.2.1. Localização e caracterização

O tecido adiposo branco é o principal constituinte do tecido adiposo, que contém a maior parte da gordura total do organismo, sendo encontrado ao longo de todo o corpo, principalmente sob a pele (subcutâneo), assim como em depósitos intra-abdominais, como por exemplo no intestino e áreas peri-renais (visceral) (Caruso et al., 2010; Gesta et al., 2007; Owens, 2014). É um tecido complexo constituído maioritariamente por adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, células estaminais mesenquimatosas, macrófagos e leucócitos (Matafome et al., 2012). Para além disso, possui uma grande e dinâmica rede vascular, que lhe permite a constante remodelação, sendo crucial tanto para a sua expansão como regressão (Rodrigues et al., 2013; Rutkowski et al., 2009). Estas características permitem-lhe estar envolvido em duas “funções-chave”, no controlo do metabolismo através da homeostasia energética e sensibilidade à insulina, e no controlo da produção e ativação de moléculas e mecanismos de sinalização anti-inflamatórios (Caruso et al., 2010; Rodrigues et al., 2013).

1.2.2.2. Metabolismo

O tecido adiposo branco tem vindo a ser reconhecido como o principal local de armazenamento do excesso de energia derivada da alimentação e como fonte de lípidos

para outros tecidos do organismo (Guilherme et al., 2008; Kusminski et al., 2016; Rosen & Spiegelman, 2006; Scherer, 2006).

Os adipócitos brancos, tipo de célula predominante neste tecido, são responsáveis pelo armazenamento de lípidos em acumulações intracelulares de triglicerídeos, chamadas gotas lipídicas, sendo rapidamente ativada a sua hidrólise, processo conhecido por lipólise (Guilherme et al., 2008; Rosen & Spiegelman, 2006). Desta forma, em períodos de jejum, a lipólise é ativada, havendo hidrólise sequencial de uma molécula de triglicerídeos, promovendo a formação e libertação de três moléculas de ácidos gordos e uma de glicerol para o citoplasma. Posteriormente estes AGLs são transportados por lipoproteínas para outros tecidos, a fim de serem oxidados pelas mitocôndrias, produzindo a energia necessária para o organismo, havendo um equilíbrio entre os AGLs na circulação e a sua absorção e oxidação nos tecidos periféricos (Caruso et al., 2010; Gesta et al., 2007; Guilherme et al., 2008; Rosen & Spiegelman, 2006). Para além de ser ativada em jejum, a lipólise também pode ser ativada em resposta a vários estímulos hormonais, como as catecolaminas, pois o tecido adiposo possui inervações do SNS e recetores β 3-adrenérgicos (β 3-AR) (Caruso et al., 2010; Nielsen et al., 2014). Deste modo, as catecolaminas são responsáveis por ativar a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) pela enzima adenilato ciclase (AC). Como o AMPC é um ativador forte da proteína cinase A (PKA), enzima responsável por fosforilar e ativar a enzima lípase hormono-sensitiva (HSL), que por sua vez é enzima responsável pela hidrólise dos triglicerídeos armazenados no interior da gota lipídica, vai ocorrer a ativação da lipólise (Matafome et al., 2015; Nielsen et al., 2014).

Papel da sinalização da insulina: A insulina tem um papel muito importante neste órgão, uma vez que a sua sinalização regula o metabolismo lipídico e glicémico (Beale,

2013; Ye, 2013). Deste modo, induz a lipogénese e inibe a lipólise, no período pós-prandial, favorecendo o armazenamento dos triglicéridos, assim como a ação da perilipina A (PerA), responsável pelo revestimento da gota lipídica, impedindo a ação da HSL e a circulação de AGLs no citoplasma. Da mesma forma, também é um repressor da AC, fazendo com que haja uma diminuição dos níveis de AMPc, favorecendo também o armazenamento dos triglicéridos (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015). Para além disso, outro efeito da ação da insulina neste órgão é a captação da glicose, através da ativação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4). Este mecanismo de sinalização é iniciado pela ligação desta hormona ao seu recetor, recetor de insulina (IR), ativando-o, sendo posteriormente ativado sequencialmente o substrato do recetor de insulina (IRS), o fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), a proteína cinase B (PKB), conhecida como AKT, e por fim o GLUT-4. Estes mecanismos resultam na translocação desta proteína (GLUT-4) do citoplasma para a superfície da membrana plasmática, permitindo a captação e absorção da glicose neste tecido (Figura 3) (Alghamdi et al., 2014; Beale, 2013; Matafome et al., 2015; Ye, 2013).

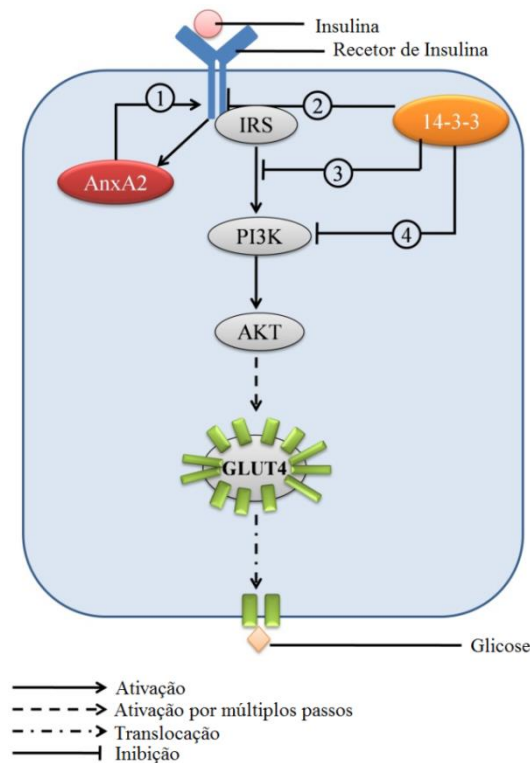


Figura 3 - Via de sinalização do recetor de insulina para a absorção da glicose extracelular.

Abreviaturas: IRS: Substrato do recetor de insulina; PI3K: fosfatidilinositol 3-cinase; AKT ou PKB: proteína cinase B, GLUT-4: transportador da glicose tipo 4; AnxA2 e 14-3-3: Anexina A2 e 14-3-3 proteínas associadas à resistência à insulina (adaptado de Liu et al., 2012).

PPAR- γ na regulação metabolismo: O *Peroxisome-proliferato-activated receptor- γ* (PPAR- γ) é um recetor nuclear que é ativado principalmente por lípidos, sendo um fator de transcrição regulado pela dieta, e um importante fator regulador transcripcional da adipogénese (mecanismo de crescimento de novas células no tecido adiposo) (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2013; Matafome et al., 2015; Tamori et al., 2002).

É responsável pela expressão de enzimas envolvidas na absorção dos AGLs da circulação, como a CD36 (recetores presentes na membrana dos adipócitos) e lipoproteína lipase (LPL), enzima envolvida na hidrólise de triglicéridos transportados pelas lipoproteínas, permitindo a entrada de ácidos gordos no adipócito, através de uma proteína específica de transporte (FATP). Estes sofrem posteriormente, nova

esterificação em triglicerídeos e de seguida são armazenados na gota lipídica (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2013, Matafome et al., 2015). É também responsável pela expressão de enzimas envolvidas na esterificação, pela síntese de proteínas como a PerA e da hormona adiponectina (Matafome et al., 2014). Esta hormona é responsável pela inibição da expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) em macrófagos, sendo responsável pela inativação da cascata inflamatória, apresentando elevada capacidade anti-inflamatória (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2013; Matafome et al., 2015; Vona-Davis & Rose, 2007). Além disto, o PPAR- γ foi identificado como recetor de tiazolidinedionas (TZD), que são uma classe de agentes antidiabéticos orais, amplamente utilizados para aumentar a sensibilidade à insulina em pacientes diabéticos, ou seja, ajudam a melhorar os níveis de glicemia e a reduzir a resistência à insulina periférica (Figura 4) (Kusminski et al., 2016; Lyons et al., 2016; Tamori et al., 2002).

AMPK enzima modeladora de vários processos metabólicos: A adiponectina é responsável pela ativação da proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMP) (AMPK), importante regulador energético, sendo responsável pela resposta do metabolismo celular para as variações nutricionais (Lyons et al., 2016; Matafome et al., 2013).

Esta enzima atua na ativação da glicólise e na oxidação de ácidos gordos, e na inibição da gliconeogénese e na síntese de ácidos gordos e colesterol, de forma a gerar adenosina trifosfato (ATP). Está também envolvida no aumento da expressão de várias enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos gordos e na diminuição da expressão de outras enzimas responsáveis pela síntese de ácidos gordos, como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e a ácido gordo sintase (FAS). A enzima FAS é responsável pela

formação do palmitato, a partir da acetil-CoA e malonil-CoA, sendo este posteriormente transformado em triglicerídeos e armazenado sob esta forma, na gota lipídica. A ACC sendo inibida diretamente pela AMPK, leva à diminuição da formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, sendo esta dirigida para a mitocôndria, promovendo o ciclo de Krebs. Para além disto, a AMPK também ativa a PI3K e a AKT, induzindo a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática, permitindo o aumentando da absorção de glicose. Está também envolvida no processo de degradação do AMPc, levando à inativação do PKA e conseqüentemente da lipólise (Hardie, 2004; Lyons et al., 2016; Matafome et al., 2013; Matafome et al., 2014; Ruderman et al., 2013). Indivíduos que possuam obesidade, assim como DMTII, ou seja, indivíduos que apresentam resistência à insulina, geralmente possuem níveis mais baixos de adiponectina e conseqüentemente de AMPK, apresentando níveis mais baixos de oxidação de ácidos gordos (Lyons et al., 2016; Matafome et al., 2013; Ruderman et al., 2013).

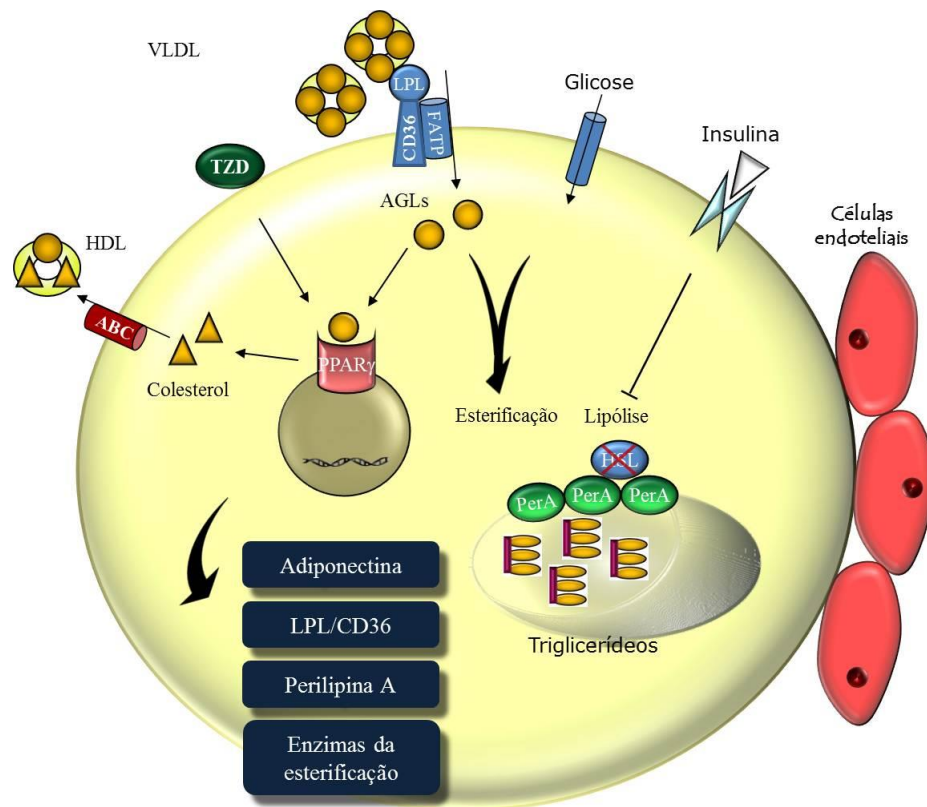


Figura 4 - Fisiologia e as várias funções metabólicas que ocorrem no tecido adiposo branco.

Abreviaturas: VLDL: Proteínas de baixa densidade; HDL: Proteínas de alta densidade; LPL: Lipoproteína lipase; TZD: Tiazolidinedionas; FATP: Proteína específica de transporte de lípidos; AGLs: Ácidos gordos livres; PerA: Perilipina A; HSL: Enzima lípase hormono-sensitiva e PPAR- γ : *Peroxisome-proliferato-activated receptor- γ* (adaptado de Matafome *et al.*, 2012).

1.2.2.3. Regulação endócrina

Para além de seu papel no metabolismo dos lípidos e da glicose, o tecido adiposo branco, tem vindo a ser reconhecido como um órgão endócrino extremamente complexo, servindo como regulador da homeostasia energética, tornando-se desta forma a maior glândula endócrina do organismo (Caruso *et al.*, 2010; Guilherme *et al.*, 2008; Kusminski *et al.*, 2016). Tal facto tem vindo a ser evidenciado pela descoberta da secreção de várias moléculas biologicamente ativas, entre elas, as adipocinas, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores inflamatórios (Borcherding *et al.*, 2011;

Caruso et al., 2010; Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2013). Desta forma, o secretoma do tecido adiposo é constituído por adipocinas, grupo que inclui hormonas como a adiponectina, resistina, leptina, visfatina, vaspina, omentina e apelina, fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), citocinas como o TNF- α , a IL-6 e outra variedade de interleucinas, quimiocinas como a proteína quimioatratora de monócitos (MCP-1), e um conjunto de outros fatores como o inibidor de plasminogénio (PAI-1), a angiotensina II e as metaloproteinases (MMP) (Caruso et al., 2010; Matafome et al., 2013).

As adipocinas estão envolvidas em processos como o controlo do apetite e da saciedade, sensibilidade à insulina, metabolismo da glicose e dos lípidos, regulação da pressão arterial e da inflamação (Figura 5) (Caruso et al., 2010; Matafome et al., 2013). Deste modo, a alteração do secretoma na obesidade e DMTII contribui também para o desencadear do processo inflamatório e para a desregulação do metabolismo do tecido adiposo branco (Caruso et al., 2010).

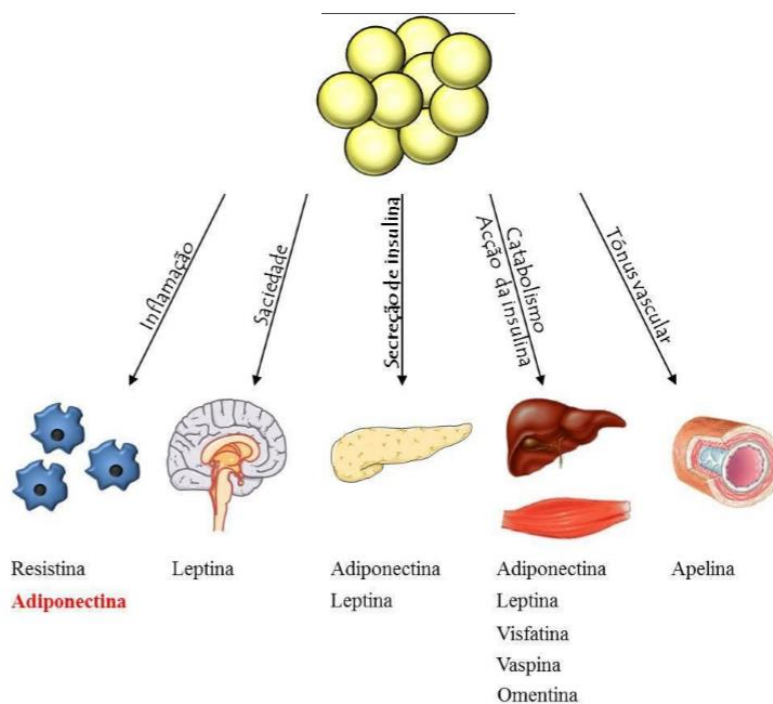


Figura 5 - As adipocinas e as suas principais funções (adaptado de Matafome et al., 2012).

1.2.2.4. Desregulação do metabolismo

O tecido adiposo branco desempenha um papel importante na proteção contra doenças metabólicas por ser o local de armazenamento de ácidos gordos, que podem ser tóxicos para outros tecidos (Owens, 2014). No entanto, quando os adipócitos armazenam triglicérides em excesso pode ocorrer hipertrofia e desregulação metabólica, característica da insulino-resistência na obesidade e DMII (Guilherme et al., 2008; Kusminski et al., 2016; Matafome et al., 2013; Matafome et al., 2015; Owens, 2014).

Hipertrofia dos adipócitos: Uma consequência inicial da hipertrofia é a acumulação de produtos secundários do metabolismo lipídico como o diacilglicerol e ceramidas (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2014; Matafome et al., 2015). No entanto, outra consequência da hipertrofia é a diminuição da irrigação sanguínea devido ao aumento de volume deste tecido, levado a cabo pelo aumento de AGLs no citoplasma, contribuindo desta forma, para a falta de oxigénio nos adipócitos, havendo formação de regiões de hipóxia. Consequentemente estes eventos são responsáveis pelo desenvolvimento do estado de inflamação de baixo grau, levando à ativação de processos de inflamação celular no adipócito, contribuindo assim para a resistência à insulina, deficiente armazenamento lipídico, diminuição da absorção de glicose assim como a alteração do seu secretoma (Guilherme et al., 2008; Hosogai et al., 2007; Matafome et al., 2015). Posteriormente, os AGLs são libertados para a corrente sanguínea e vão acumulando-se ectopicamente noutros tecidos metabolicamente ativos como o fígado, músculo-esquelético e pâncreas. (Golay & Ybarra, 2005; Guilherme et al., 2008; Lyons et al., 2016; Matafome et al., 2015).

O culminar dos mecanismos de “lipotoxicidade” no adipócito: O desenvolvimento do estado de inflamação crónica de baixo grau leva à infiltração de macrófagos no tecido, potenciando uma resposta inflamatória, através da secreção de fatores pró-inflamatórios como por exemplo, o TNF- α , quimioatratantes e fatores de crescimento da rede vascular como o VEGF e Resistina (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015; Wellen & Hotamisligil, 2005).

A nível molecular há inibição do PPAR- γ (levando à diminuição da expressão de enzimas envolvidas na absorção e na esterificação dos ácidos gordos), diminuição da esterificação lipídica, ativação da lipólise e o aumento os retores de membrana *Toll-like* (TLR), promovendo o aumento de AGLs no citoplasma e a de ativação vários mecanismos inflamatórios (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015; Rodrigues et al., 2013; Wellen & Hotamisligil, 2005). Verifica-se, em consequência, a ativação de várias isoformas da proteína cinase C (PKC), cinases do N-terminal Jun (JNK) e a translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) para o núcleo (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015; Rodrigues et al., 2013; Wellen & Hotamisligil, 2005). A ativação da via inflamatória do NF- κ B é a explicação para a inativação do PPAR- γ e para o aumento da expressão de fatores angiogénicos como o VEGF, citocinas, quimiocinas (MCP-1), sendo estes responsáveis pela infiltração de macrófagos para o local (Guilherme et al., 2008; Kusminski et al., 2016; Matafome et al., 2015; Rodrigues et al., 2013; Wellen & Hotamisligil, 2005) (Figura 6).

Com a inibição da atividade do PPAR- γ , a expressão da hormona com propriedades anti-inflamatória, a adiponectina, também é diminuída, exercendo efeitos negativos sobre a sensibilidade da insulina (Matafome et al., 2015; Ye, 2009). Em adição, sabe-se que a ativação das vias inflamatórias PKC, JNK e do inibidor cinase do fator nuclear kappa- β (IKK β) (responsável pela translocação do NF- κ B para o núcleo)

também têm consequências diretas na via do recetor de insulina, devido a estas proteínas serem serinas cinases que fosforilam este recetor (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015; Wellen & Hotamisligil, 2005). Outros estudos mostraram que o TNF- α secretado pelos macrófagos, também afeta esta sinalização, uma vez que aumenta o AMPc, levando à degradação da PerA, e a ligação da HSL aos triglicéridos, promovendo a lipólise (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015). Por fim, sabe-se igualmente que o TNF- α afeta a ação do GLUT-4, reduzindo a absorção da glicose para o interior do adipócito (Figura 6) (Lyons et al., 2016). Deste modo, o culminar destes mecanismos compromete a sinalização da insulina, tornando o adipócito insulino-resistente (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015; Owens, 2014; Rodrigues et al., 2013).

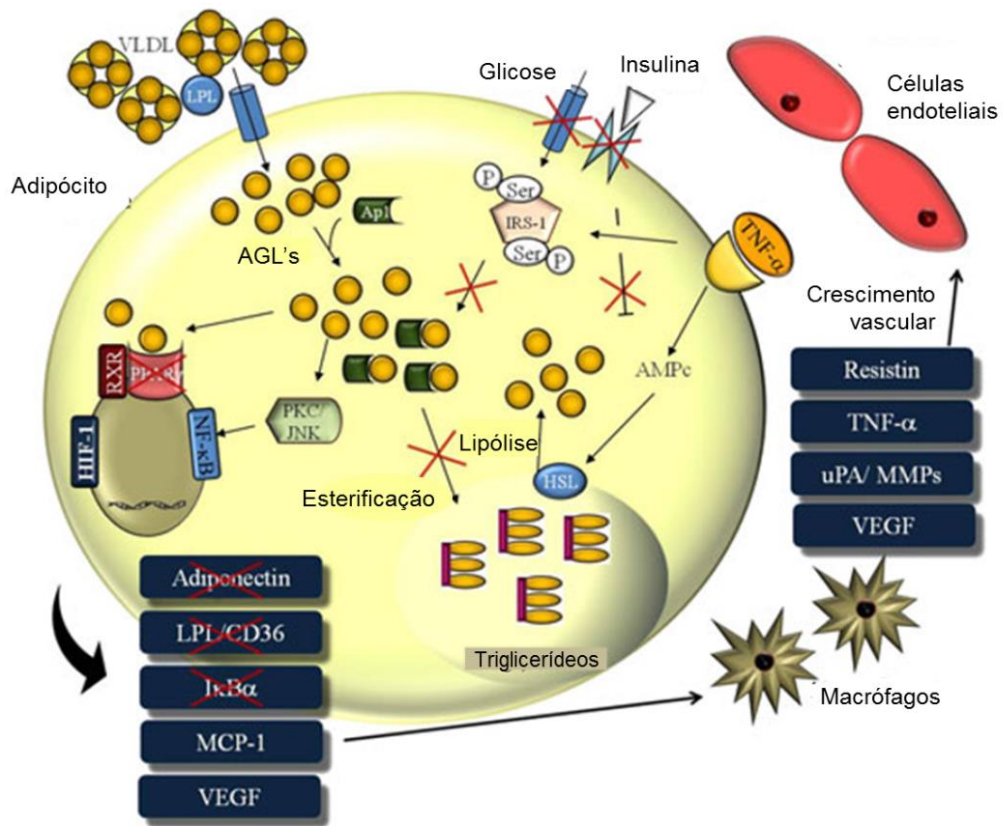


Figura 6 - Mecanismo de inflamação crónica de baixo grau, que ocorre no tecido adiposo branco, na obesidade e consequentemente na DMII, com ativação de mecanismos que levam à resistência à insulina, lipólise e inibição do PPAR- γ .

Abreviaturas: VLDL: Proteínas de baixa densidade; LPL: Lipoproteína lipase; AGLs: Ácidos gordos livres; Ap1: proteína adaptadora; HSL: Enzima lípase hormono-sensitiva; RXR: Recetor retinóide X do PPAR- γ ; PPAR- γ : *Peroxisome-proliferato-activated receptor- γ* ; HIF-1: Fator de resposta à hipoxia; JNK: Cinase do N-terminal Jun; PKC: Proteína cinase C; NF-kB: Fator nuclear kappa B; I κ B α : Inibidor alfa da via NF-kB; MCP-1: Proteína quimioatratora de monócitos; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; TNF- α : Fator de necrose tumoral- α ; IRS-1: Substrato do recetor de insulina; Ser: Serina; P: fosfato; AMPc: Adenosina monofosfato cíclica; MMPs: Metaloproteínases de matriz e uPA: Urocinase ativador do plasminogénio (adaptado de Rodrigues et al., 2013).

1.3. "Sistema nervoso autónomo e os seus neurotransmissores desempenham um papel importante na regulação do tecido adiposo"

O SNS é um componente do sistema nervoso autónomo (SNA) que desempenha um papel importante em vários processos metabólicos (Conde et al., 2014; Vargovic et al., 2011). Deste modo, nas doenças metabólicas (SM, obesidade e DMTII), verifica-se um aumento da ativação simpática, associada à hiperinsulinemia, levando a um aumento da concentração de AGLs na circulação e a ativação de processos inflamatórios, levando ao desenvolvimento da resistência à insulina e da tolerância diminuída à glicose (Conde et al., 2014; Huggett et al., 2003; Ribeiro et al., 2013).

1.3.1. As catecolaminas

As catecolaminas são conhecidas hormonas e neurotransmissores do SNS, que medeiam respostas fisiológicas essenciais, sendo as mais abundantes a dopamina, a adrenalina e a noradrenalina, também chamada de norepinefrina (Barnes et al., 2015; Borcherding et al., 2011; Sarkar et al., 2013).

São sintetizadas a partir do aminoácido tirosina, obtido principalmente na dieta. A síntese de catecolaminas tem duas enzimas principais, a tirosina hidroxilase (TH), conhecida por desencadear o passo limitante da reação, determinando a velocidade de reação, de produção das catecolaminas, e a dopamina- β -hidroxilase (D β H), responsável por converter a dopamina em norepinefrina. Deste modo, a dopamina é a primeira catecolamina sintetizada, a partir da 1-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA), reação catalisada pela descarboxilase do L-aminoácido aromático (AADC), seguida da

conversão sequencial em norepinefrina e adrenalina (Figura 7) (Barnes et al., 2015; Flierl & Rittirsch, 2008; Rios et al., 1999; Vargovic et al., 2011; Vieira-Coelho et al., 2009).

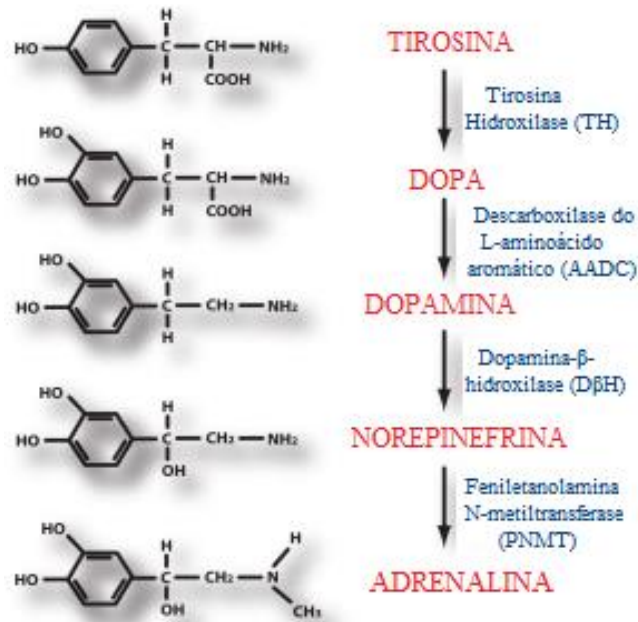


Figura 7 - Síntese das catecolaminas (adaptado de Flierl & Rittirsch, 2008).

São sintetizadas no sistema nervoso central, nas células nervosas, assim como em órgãos e células periféricas, principalmente nas células da medula suprarrenal (em maior quantidade a adrenalina, mas também há produção de dopamina) e células imunitárias (Linfócitos T, B e em macrófagos) (Barnes et al., 2015; Flierl & Rittirsch, 2008; Sarkar et al., 2013; Vargovic et al., 2011). Estudos mostram também a expressão de maquinaria celular para a produção de enzimas envolvidas na biossíntese das catecolaminas nos adipócitos, demonstrando importância destas hormonas na regulação deste órgão (Vargovic et al., 2011).

1.3.1.1. Mecanismos de ação no tecido adiposo

As catecolaminas noradrenalina e adrenalina são importantes mediadores da função no tecido adiposo, uma vez que quer o tecido adiposo branco, quer o castanho, contêm enervações do SNS e recetores adrenérgicos (AR) (Caruso et al., 2010; Harris, 2012; Nielsen et al., 2014). Desta forma, a maneira como regulam a lipólise é bastante incomum, uma vez que são capazes de estimular e inibir a lipólise dependendo da sua afinidade com os diferentes AR presentes na membrana do adipócito (Nielsen et al., 2014; Scanzano & Cosentino, 2015). Assim, a estimulação da lipólise requer a ativação dos β -AR, enquanto a inibição da mesma requer a ativação dos recetores α_2 -adrenérgicos (α_2 -AR) (Nielsen et al., 2014). Ambos os recetores pertencem ao recetor acoplado à proteína G, no entanto a proteína G associada aos α_2 -AR contém a subunidade G_i inibitória, enquanto os β -AR têm a subunidade G_s estimulatória da AC (Nielsen et al., 2014). Ou seja, quando ativada, a AC converte o ATP em AMPc, resultando num aumento dos níveis deste segundo mensageiro no citoplasma, o que por sua vez leva à ativação da PKA e à fosforilação da PerLA e da enzima HSL, que se encontram na gota lipídica, iniciando a cascata lipolítica, como anteriormente já referido (Figura 5) (Matafome et al., 2015; Nielsen et al., 2014).

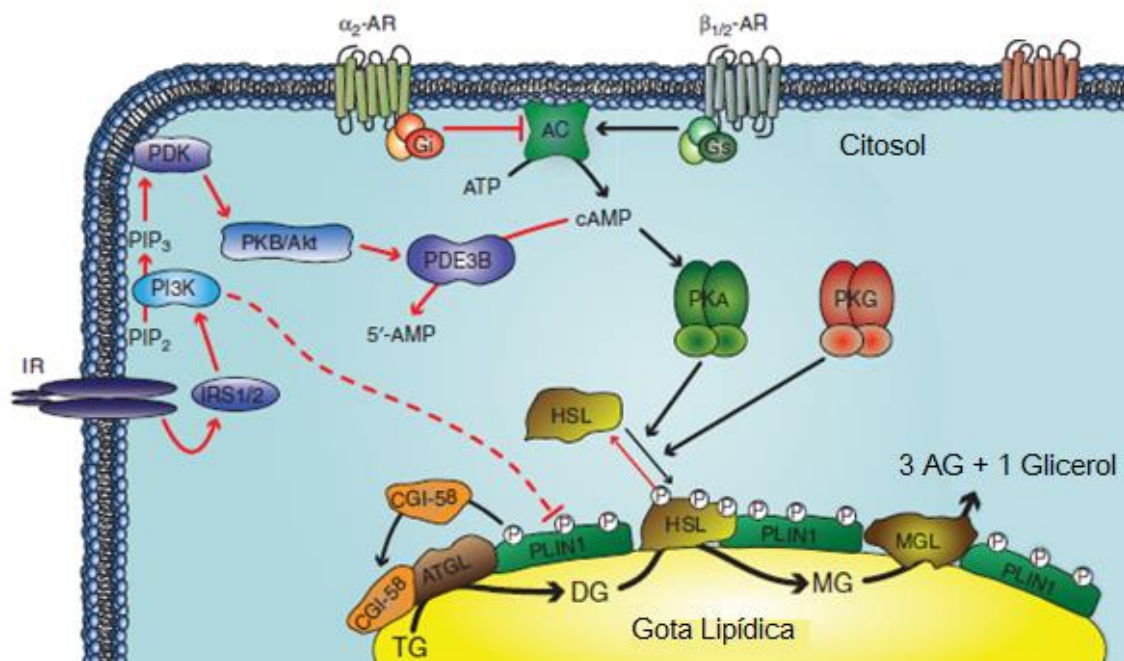


Figura 8 - Vias de sinalização adrenérgica envolvidas na ativação e inibição da lipólise; Via de sinalização do recetor de insulina na inibição da lipólise, ambas as vias no tecido adiposo.

Abreviaturas: IR: Recetor de insulina; IRS: Substrato do recetor de insulina; PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinase; PKB: Proteína cinase B ou AKT; PDK: Proteína cinase dependente de fosfoinosítido AR: Recetor adrenérgico; Gi: Subunidade G inibitória; Gs: Subunidade G estimulatória; AC: Adenilato ciclase; AMPc: Adenosina monofosfato cíclica; ATP: Adenosina trifosfato; PKA: Proteína cinase A; PKG: Proteína cinase G; PDE3B: Fosfodiesterase 3B; AMP: Adenosina monofosfato; ATGL: Adipose triglyceride lipase; PLIN1: Perlipina A; HSL: Lipase hormono-sensitiva; TG: Triglicerídeos; DG: Diacilglicerol; MG: Monoacilglicerol e AG: Ácidos gordos.

Setas a preto indicam a ativação, setas a vermelho indicam a inibição (adaptado de Nielsen et al., 2014).

1.3.2. Catecolaminas: Dopamina

A dopamina é a principal catecolamina presente no cérebro, sendo principalmente sintetizada na área tegmental ventral e por neurónios mesencefálicos da substância negra (Baik, 2013a, 2013b). No entanto, também é sintetizada a nível periférico, principalmente nas células da medula suprarrenal, no rim, tecido adiposo, assim como no corpo carotídeo (Choi, 2015; Conde et al., 2006; Conde et al., 2008; Lopez-candales et al., 2017; Vargovic et al., 2011).

À semelhança de outras catecolaminas, também é considerada um composto pleiotrópico, uma vez que pode atuar como um neurotransmissor e como hormona (Baik, 2013b; Borcharding et al., 2011).

1.3.2.1. Mecanismos de ação

A dopamina, ao contrário da adrenalina e da noradrenalina, que interagem com AR presentes na superfície das membranas, atua em recetores dopaminérgicos (DR). Deste modo, pode interagir com cinco recetores acoplados às proteínas G, podendo ser divididos em dois grupos, que diferem funcionalmente pelas vias de sinalização que modulam, ou seja, os recetores ligados à ativação da AC “D1-like” (D1R e D5R) e os recetores que levam à inibição da AC, como “D2-like” (D2R, D3R e D4R) (Baik, 2013b; Borcharding et al., 2011). A AC é a enzima responsável pela transformação de ATP em AMPc (como explicado anteriormente), sendo os recetores classificados consoante sua capacidade de aumentar ou diminuir a síntese deste segundo mensageiro (Borcharding et al., 2011; Matafome et al., 2015; Nielsen et al., 2014). Assim sendo, quando há ativação dos recetores “D1-like”, há também a ativação da AC, havendo um aumento da concentração de AMPc, e conseqüentemente a ativação da PKA. Por outro lado, a ativação dos recetores “D2-like” regula negativamente a produção AMPc (Baik, 2013b; Borcharding et al., 2011).

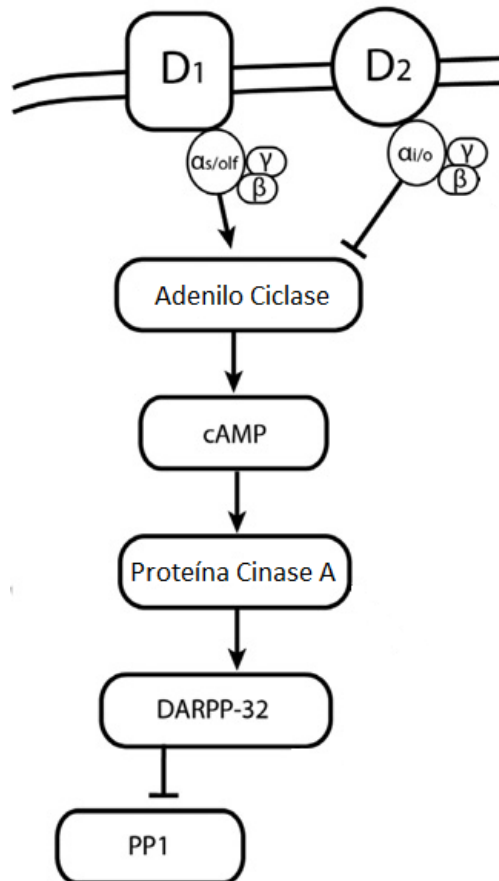


Figura 9 - Via de sinalização dos receptores dopaminérgicos D1 e D2.

Abreviaturas D1 e D2: Receptores de dopamina; α_s : Subunidade α estimulatória e α_i : Subunidade α inibitória; AMPc: adenosina monofosfato cíclica; DARPP-32: Fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc (kDa 32) e PP1: proteína fosfatase 1 (adaptado de Abraham et al., 2014).

Apesar desta via de sinalização dopaminérgica envolver a produção de AMPc, segundo mensageiro responsável pela regulação de vários processos biológicos, como a regulação do metabolismo dos lípidos, no tecido adiposo, estes mecanismos ainda não foram totalmente compreendidos. No entanto, dados recentes mostraram a expressão de receptores de dopamina em adipócitos funcionais, enfatizando um novo papel da dopamina e da sua sinalização periférica, indicando que pode estar envolvida na regulação do metabolismo neste órgão, com implicações para a homeostasia metabólica e na ação de doenças metabólicas (SM e DMTII) (Borcherding et al., 2011).

1.4. “Corpo carotídeo responsável pela produção de dopamina periférica”

1.4.1. Caracterização e mecanismos de ação

O corpo carotídeo é um órgão altamente especializado, que se encontra localizado bilateralmente na bifurcação das artérias carótidas. É caracterizado por ter uma vascularização rica e o maior fluxo de sangue por unidade de peso em comparação a qualquer tecido do organismo, recebendo o sangue através de uma arteríola proveniente da artéria carótida (Conde et al., 2014; Nurse, 2014; Sacramento et al., 2016).

É o principal órgão quimiorrecetor periférico, que tem como função detetar alterações no sangue arterial, como baixas concentrações de oxigénio, altas concentrações de dióxido de carbono e baixos níveis de pH, sendo ativado respetivamente por hipóxia, hipercapnia, acidose e redução do fluxo de sangue arterial (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Holmes et al., 2014; Iturriaga et al., 2016; Ortega-Sáenz et al., 2013). Quando existe uma destas alterações, o corpo carotídeo é ativado, induzindo uma resposta, aumentando a frequência de potenciais de ação no nervo sensorial, o nervo do seio carotídeo. Desta forma, ocorre a indução da resposta visando um mecanismo de normalização, através da ativação do SNS, sendo este responsável por estimular ações que possibilitam o organismo responder a situações de *stress*, ou seja, induzir reflexos respiratórios destinados a normalizar os gases no sangue arterial, através de hiperventilação, regular a pressão sanguínea e o desempenho cardíaco (Conde et al., 2006; Conde et al., 2008; Conde et al., 2014; Holmes et al., 2014; Sacramento et al., 2016).

No nervo do seio carotídeo existe a crista neural, que é o local onde existem células quimiorrecetoras, também conhecidas como glomus ou células tipo I que,

quando estimuladas pelos fenómenos em cima descritos, secretam os seus neurotransmissores (através do encerramento dos canais de potássio na membrana plasmática, desencadeando a despolarização da membrana e o aumento do influxo de cálcio). Estas células, posteriormente, são responsáveis por ativar as terminações nervosas sensoriais do nervo do seio carotídeo e que, através do nervo glossofaríngeo, envia esse sinal para o tronco cerebral (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Holmes et al., 2014; Nurse, 2014; Ortega-Sáenz et al., 2013). Apesar de a natureza dos neurotransmissores envolvidos ainda não ser completamente conhecida, sabe-se que incluem substâncias como as catecolaminas (dopamina e norepinefrina), serotonina, acetilcolina, neuropeptídeos, adenosina e ATP (Conde et al., 2006; Conde et al., 2008; Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Gonzalez et al., 2014; Ortega-Sáenz et al., 2013).

O corpo carotídeo possui ainda outro tipo de células, as células do tipo II, ou células de sustentação, tendo sido propostas como células estaminais neuronais, que contribuem para o crescimento deste órgão em condições de hipóxia crónica, e atuando na sinalização parácrina durante a hipóxia (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Holmes et al., 2014; Nurse, 2014; Ortega-Sáenz et al., 2013).

1.4.2. Sensor metabólico

Na última década, a noção de que o corpo carotídeo pode estar envolvido na regulação da homeostasia metabólica tornou-se cada vez mais sólida.

Estudos têm mostrado que o corpo carotídeo, mais concretamente as células do tipo I, participam de forma crítica na regulação da glicose, tornando este órgão um potencial “glicosensor” (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Zhang et al., 2007). Desta

forma, em vários estudos com modelos animais, assim como em humanos, foi evidenciando que o corpo carotídeo é ativado em baixas concentrações de glicose no sangue, ou seja, numa situação de hipoglicemia (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; García-Fernández et al., 2007; Wehrwein et al., 2010; Zhang et al., 2007). No entanto, este tema é bastante controverso, uma vez que muitos grupos de investigação ainda não conseguiram validar esta capacidade de deteção da glicose neste órgão (Bin-Jaliah et al., 2004; Gallego-Martin et al., 2012; Holmes et al., 2014).

Para além disto, recentemente, foi também proposto que a insulina poderia atuar como regulador da resposta do corpo carotídeo para a hipoglicemia (Bin-Jaliah et al., 2004; Gao et al., 2014; Limberg et al., 2014). Isso foi demonstrado pela existência de recetores de insulina neste órgão e a fosforilação dos mesmos em resposta à sua ação (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Ribeiro et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que a insulina também foi capaz de induzir um aumento de cálcio intracelular nas células quimiorrecetoras, provocando a libertação de ATP e dopamina, e de desencadear uma resposta hiperventilatória (Conde et al., 2014; Ribeiro et al., 2013). No entanto, estudos mostraram que numa situação de hiperinsulinemia, em modelo animal induzido com dieta hipercalórica, desencadeou-se um processo de sobreativação (disfunção) do corpo carotídeo, conduzindo à resistência à insulina periférica, hipertensão, aumento da sinalização simpática e o aumento de catecolaminas no sangue (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Ribeiro et al., 2013). Com a ressecção bilateral crónica do nervo do seio carotídeo, ou desnervação do corpo carotídeo, este processo foi revertido, mostrando uma melhoria da sensibilidade à insulina e da hipertensão arterial. Desta forma, estes resultados sugerem uma relação entre a disfunção do corpo carotídeo e o desenvolvimento da resistência à insulina, representado uma nova abordagem terapêutica inexplorada na DMTII (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Ribeiro et al.,

2013). Em adição, o mesmo procedimento foi realizado no modelo animal controle, verificando-se igualmente a melhoria da sensibilidade à insulina, evidenciado o envolvimento deste órgão no controle metabólico em condições fisiológicas (Conde et al., 2014; Ribeiro et al., 2013).

1.4.3. Desnervação do corpo carotídeo

Estudos realizados em modelo animal com SM induzida por dieta hipercalórica mostram que a ressecção bilateral crônica do nervo do seio carotídeo ou desnervação do corpo carotídeo leva à inatividade deste órgão. Assim, apesar da suplementação com a dieta hipercalórica, esta inatividade repõe a ação da insulina, da pressão sanguínea e do perfil lipídico, levando à normalização da insulinemia e da glicemia em jejum, assim como dos AGLs na circulação. Foi também mostrado uma normalização da via de sinalização de insulina no músculo-esquelético e no tecido adiposo, assim como melhoria da absorção da glicose no fígado e no tecido adiposo perientérico (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2016). Estes resultados demonstram, desta forma, que a inativação do corpo carotídeo por desnervação reverte as características principais do metabolismo em doenças metabólicas, como a resistência à insulina, hipertensão e hiperglicemia, sendo um novo alvo terapêutico promissor contra as doenças metabólicas (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2016).

CAPÍTULO 2

Objetivos

Capítulo 2. Objetivos

Uma vez que o corpo carotídeo parece estar implicado na regulação da homeostasia energética recorrer-se-á à resseção bilateral crónica do nervo do seio carotídeo, como objetivo de avaliar o seu envolvimento na melhoria do perfil metabólico num modelo animal de DMTII com hiperlipidemia. Pretende-se estudar o seu envolvimento na sensibilidade à insulina e perfil glicémico, bem como nos mecanismos de armazenamento e metabolismo lipídico no tecido adiposo.

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

Capítulo 3. Materiais e Métodos

3.1. Modelo animal

Para a realização deste trabalho foram usadas duas estirpes de ratos diferentes, ratos *Wistar* (W), um modelo animal normal, e ratos *Goto-Kakizaki* (GK), um modelo animal não obeso com DMTII. O rato GK é resultante de um cruzamento seletivo entre ratos *Wistar*, com níveis mais elevados de glicemia, apresentando desta forma, hiperglicemia moderada, resistência à insulina e deficiente secreção da mesma, desenvolvendo complicações associadas à DMTII, semelhantes às que ocorrem no ser humano.

Ambas as colónias foram provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal, no qual todos os animais foram mantidos em condições-padrão de ventilação, temperatura (22-24°C), humidade (50-60%), num ciclo de luz/obscuridade de doze horas e com um acesso livre a água e à respetiva ração.

Os protocolos experimentais com os modelos animais foram previamente aprovados pelo Comité de Ética local, tendo sido seguidas igualmente as recomendações internacionais de utilização e manutenção de animais de laboratório. Todos os procedimentos com os animais foram efetuados por pessoas devidamente habilitadas (Curso válido para a Federação Europeia das Associações Científicas e de experimentação Animal – FELASA, com certificação da Direção Geral de Veterinária).

Foram usados para a realização deste trabalho, cinco grupos diferentes de ratos, os quais foram estudados entre 4 e as 23 semanas de idade (n=5-10/grupo):

1. Ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03, SAFE, Barcelona), usados como grupo controlo (W_SD) (n=10);
2. Ratos GK mantidos com dieta normal (*standard diet* A03, SAFE, Barcelona), usados como grupo controlo diabético não hiperlipidémico (GK_SD) (n=10);
3. Ratos GK mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida com gorduras e sacarose (A03 *High Fat*, SAFE, Barcelona), usados como controlo diabético hiperlipidémico (GK_HFD) (n=10);
4. Ratos GK mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida com gorduras e sacarose (A03 *High Fat*, SAFE, Barcelona), submetidos à 20ª semana de idade à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo (GK_HFD_Dn) (n=7);
5. Ratos GK mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida com gorduras e sacarose (A03 *High Fat*, SAFE, Barcelona), submetido à cirurgia *sham*, no mesmo período que o grupo GK_HFD_Dn, servindo como controlo do procedimento cirúrgico realizado (GK_HFD_Sh) (n=5).

Os grupos controlo W_SD e GK_SD foram alimentados com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, enquanto os grupos GK_HFD, GK_HFD_Dn e GK_HFD_Sh, foram alimentados com dieta A03 modificada, enriquecida com gordura e sacarose (A03 *High Fat*) entre a 4ª e a 23ª semana de vida. É de salientar que à 20ª semana de vida, os ratos GK_HFD foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, GK_HFD, GK_HFD_Dn e GK_HFD_Sh, já detalhados. À 23ª semana de vida todos grupos foram sacrificados (Figura 1).

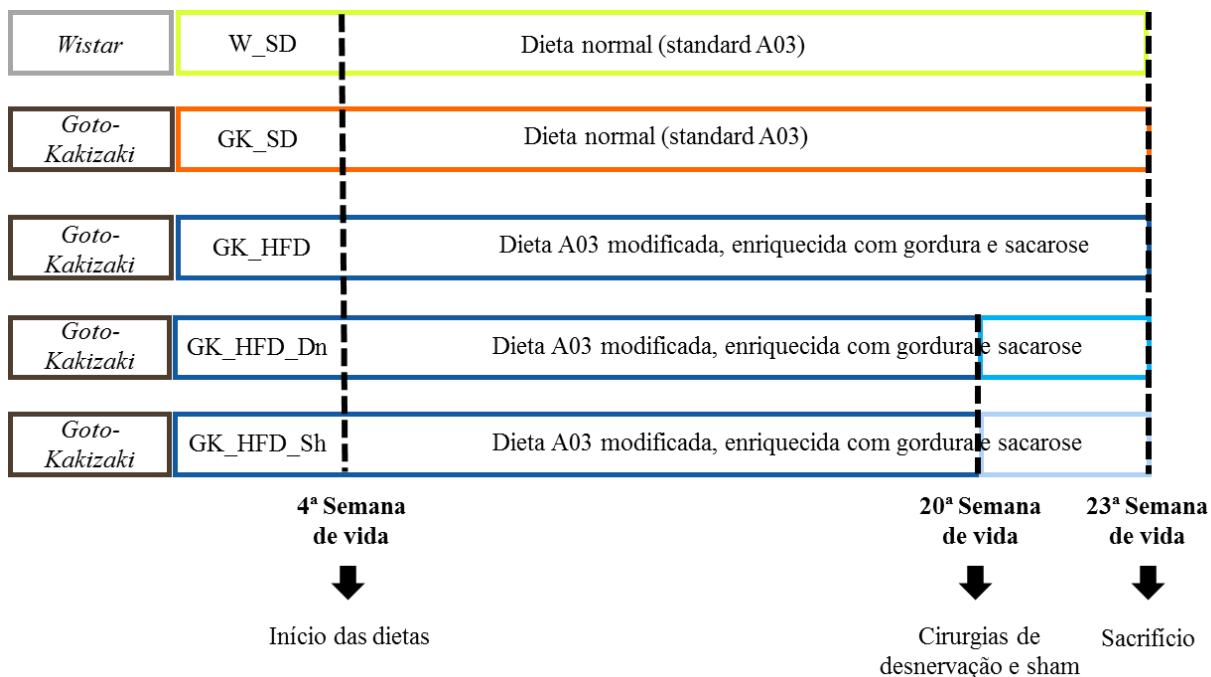


Figura 10 - Esquema temporal ilustrativo do trabalho experimental, exibindo os cinco grupos de ratos utilizados, dietas envolvidas e conseqüentes cirurgias efetuadas à 20ª semana de vida.

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, à 20ª semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20ª semana de vida.

3.2. Procedimentos cirúrgicos

3.2.1. Cirurgia de remoção do corpo carotídeo e cirurgia *sham*

À 20^a semana de idade um grupo de ratos GK foi submetido a um procedimento cirúrgico de ressecção bilateral crónica do nervo do seio carotídeo ou desnervação do corpo carotídeo (GK_HFD_Dn). Com a mesma idade, um outro grupo de ratos GK, foi sujeito a uma cirurgia *sham*, a qual tem como função apenas simular a cirurgia, ou seja, faz-se uma incisão nos ratos, seguida da sutura após tempo semelhante à duração da cirurgia, sem que nenhuma estrutura seja alterada (GK_HFD_Sh). É de salientar que estes dois grupos de animais foram mantidos durante 3 semanas até ao sacrifício (23^a semana de vida).

Ambos os procedimentos cirúrgicos iniciaram-se após a indução do estado de anestesia (solução de cloreto de catemina, 75mg/Kg, Nimatek, Dechra, Reino Unido, e cloreto de clorpromazina, 3mg/Kg, Lab. Vitória, Portugal) e uma injeção, em cada dorsal do animal, de soro fisiológico (6mL: 2,5mL em cada lado), para manter o rato hidratado durante toda a cirurgia. Para a realização das saturas foi utilizado fio absorvível de ácido poliglicólico de 17mm (Braun, Alemanha). Por fim, foi utilizado Bupernorfina (100µL/300g, Siloal, Portugal) e Carprofeno (Kg/1mL, Siloal, Portugal), como anti-inflamatórios, ambos injetados por via subcutânea. A Bupernorfina foi injetada no dia das cirurgias, ao final da tarde, e o Carprofeno, foi injetado, uma vez ao dia, durante três dias, após as cirurgias, em ambos os grupos.

3.3. Análise sistêmica *in vivo*

3.3.1. Monitorização do peso e da ração

A monitorização da ração ingerida iniciou-se na 4ª semana de vida em todos os grupos. Esta monitorização foi realizada semanalmente até ao final do estudo. Foi também avaliado o peso corporal de cada animal de 4 em 4 semanas, até ao final do trabalho experimental, sendo a última pesagem efetuado antes do sacrifício.

3.3.2. Colheita de sangue e recolha de tecidos

À 23ª semana de vida todos os grupos foram sacrificados, após a indução do estado de anestesia (solução de cloreto de catemina, 75mg/Kg, Nimatek, Dechra, Reino Unido, e cloreto de cloropromazina, 3mg/Kg, Lab. Vitória, Portugal), por deslocamento cervical, após um jejum noturno (18 horas).

Antes do sacrifício, foram colhidas amostras de sangue por punção cardíaca para isolamento de plasma, usando tubos de colheita de sangue, BD Vacutainer K3 EDTA (K3E) (Vacuette®, Greiner Bio-One, Alemanha), ou de soro, usando os tubos BD Vacutainer Z Serum Sep Clot Activator (Vacuette®, Greiner Bio-One, Alemanha). O sangue foi centrifugado a 3500rpm, durante 15 minutos a 4°C, sendo posteriormente dividido em alíquotas e armazenados a -80°C.

Logo após o sacrifício foram retirados e pesados os tecidos adiposos epididimais (TAE), lavados em solução PBS, e imediatamente congelados em azoto líquido, sendo por fim armazenados a -80°C.

3.3.3. Provas de tolerância à insulina

A prova de tolerância à insulina (PTI) foi realizada em todos os grupos, antes do sacrifício. Após jejum de seis horas, a prova de PTI iniciou-se com o registo do peso do rato e a medição da respetiva glicose em jejum. Posteriormente foi administrada uma solução de insulina (Humulin® Regular, Lilly, EUA) com soro fisiológico (0,25U/mL), por via i.p. (intraperitoneal) (Kg/1mL) e a glicemia avaliada aos trinta minutos, 1 e 2 horas após a administração. Os níveis de glicose foram determinados no sangue total da veia da cauda, com o auxílio de um glicómetro e respetivas tiras-teste de glicemia (Contour® Next, Bayer S.A., Portugal).

Com os valores obtidos foi calculada a área sob a curva (*Area Under the Curve* – AUC), com o objetivo de avaliar a sensibilidade à insulina dos grupos em estudo.

3.3.4. Níveis plasmáticos de triglicéridos e colesterol

Os níveis plasmáticos de triglicéridos e de colesterol foram avaliados em todos os grupos, igualmente antes do sacrifício, após jejum de 6 horas. Foram medidos no sangue total da veia da cauda, por um analisador automático e respetivas tiras de determinação de triglicérideos e colesterol no sangue (Accutrend® Plus/GCT, Roche Diagnostics, Alemanha).

Durante este procedimento, foi retirado sangue da cauda servindo para estudos posteriores da glucagina e insulina. As amostras de sangue foram colhidas para tubos de colheita de sangue, BD Vacutainer K3 EDTA (K3E) (Vacuette®, Greiner Bio-One, Alemanha) de seguida centrifugado a 3500rpm, durante 15 minutos a 4°C, sendo posteriormente dividido em alíquotas e armazenados a -80°C.

3.3.5. Níveis plasmáticos de insulina

A recolha de sangue da cauda, após jejum de 6 horas, antes do sacrifício (descrito na secção 3.3.4.), permitiu a avaliação dos níveis plasmáticos de insulina (insulinemia), através do *Rat Insulin ELISA kit* (Merckodia, Suécia).

3.3.6. Índice de insulino-resistência – HOMA

Após a avaliação dos níveis plasmáticos de insulina (descrito na secção 3.3.5.) e com o valor de glicemia, em jejum de 6 horas, antes do sacrifício (descrito na secção 3.3.3), foi possível determinar o índice de insulino-resistência - *homeostatic model assessment* (HOMA). Isto foi possível através de uma fórmula matemática já descrita, que permite quantificar a resistência à insulina de cada rato dos diferentes grupos. A fórmula para calcular o índice de insulino-resistência-HOMA é a seguinte:

$$HOMA = \frac{[glicose]_{mM/L} \times [insulina]_{\mu U/mL}}{22,5}$$

3.3.7. Níveis plasmáticos de glucagina

A recolha de sangue da cauda, antes do sacrifício, após jejum de 6 horas (descrito na secção 3.3.4.), permitiu a avaliação dos níveis plasmáticos de glucagina através do *Rat Glucagon ELISA kit* (Wako, Alemanha).

3.4. Análises bioquímicas

3.4.1. Reagentes utilizados

Caso de não seja referido, todos os reagentes foram comprados à Merck Darmstad (Alemanha) e Sigma-Aldrich (EUA). Para a técnica a seguir descrita, *Western Blotting*, foram usados anticorpos para detetar Calnexina (Sicgen, Portugal), IR, IR-Tyr1361, GLUT-4, PGC-1 α , UCP-1, D₁R, D₂R (Abcam, Reino Unido), AMPK, AMPK-Thr172, ACC, ACC-Ser79, FAS, PPAR- γ (Cell Signalling, EUA) e β 3-AR (Alomone Labs). Todo o material de laboratório usado para a realização desta técnica foi comprado à Bio-Rad (EUA) e Advansta (EUA).

3.4.2. Análise do TAE por *Western Blotting*

A técnica de *Western Blotting* é utilizada para determinar a expressão relativa de várias proteínas em amostras biológicas, neste caso em particular no TAE, que foi o tecido em estudo, retirado dos ratos dos diferentes grupos, logo após o sacrifício.

3.4.2.1. Preparação das amostras

A técnica iniciou-se com a homogeneização das frações de TAE (100mg), de cada rato, provenientes dos diversos grupos, em tampão de lise (1mL) gelado (tabela 1).

Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C, tendo sido recolhido o sobrenadante e novamente centrifugado. De

seguida, os sobrenadantes finais, foram divididos em alíquotas e posteriormente guardados a -80°C.

Aos homogeneizados que foram utilizados no momento da realização da eletroforese foi-lhes adicionado o mesmo volume de tampão de desnaturação (2x) (tabela 1), sonicados durante quinze segundos a um pulso de 65% e posteriormente aquecidas a 100°C, durante aproximadamente três minutos.

3.4.2.2. Eletroforese vertical (SDS-PAGE)

As amostras obtidas foram separadas por eletroforese vertical (SDS-PAGE) em géis de 1mm de espessura, com 10 poços, com gel *resolving* de poli-acrilamida a 8% e *stacking* (tabela 1).

As amostras foram carregadas por uma determinada ordem e o sistema de eletroforese foi preenchido com tampão de corrida (tabela 1). Foi utilizado num dos poços um marcador de pesos moleculares - *Protein marker multicolour (GRS)* (Grisp, Portugal), permitindo conhecer as separações das proteínas consoante o seu peso molecular no gel.

3.4.2.3. Transferência para membrana de PVDF (Flureto de Polivinilideno)

Após a eletroforese vertical (SDS-PAGE), com a separação das proteínas consoante o seu peso molecular, procedeu-se à transferência das proteínas para uma membrana de flureto de polivinilideno (PVDF) (Advansta, EUA).

Inicialmente a membrana foi ativada com metanol, durante aproximadamente 10 segundo, de seguida hidratada em água ultra pura, durante aproximadamente 1 minuto, e por fim colocada em tampão transferência (tabela 1), até o final da eletroforese. Este processo permite que a membrana se torne hidrofílica, possibilitando deste modo a passagem das proteínas, presentes no gel, para a membrana. A transferência foi realizada num sistema *Transfer Blot* (Biorad, EUA) o qual foi preenchido com tampão transferência (tabela 1), estando o sistema sempre em amperagem constante (750mA), durante aproximadamente 1 hora e 45 minutos.

Após a transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF, estas foram colocadas numa solução bloqueio, uma solução constituída por TBS com Tween 0,1% (TBS-T 0,1%), com *Bovine Serum Albumin* (BSA) a 5% (tabela 1), durante 2 horas. É de salientar que este passo é muito importante, pois permite um aumento da especificidade de ligação dos anticorpos nos passos seguintes.

3.4.2.4. Incubação e marcação com os anticorpos específicos

Após o bloqueio das membranas com TBS-T 0,1% e BSA 5%, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários, anteriormente referidos, durante a noite (*overnight*) a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram retiradas do anticorpo primário e colocadas na solução de lavagem, TBS com Tween a 0,5% (TBS-T 0,5%) (tabela 1), durante 1 hora, de modo a remover o anticorpo ligado de forma inespecífica.

Após a lavagem, as membranas foram incubadas durante 2 horas, à temperatura ambiente, com os respetivos anticorpos secundários (anti-*mouse* e anti-*goat*, Bio-Rad, EUA; anti-*rabbit*, GE Healthcare, Reino Unido).

No final das duas horas de incubação com o anticorpo secundário as membranas foram novamente lavadas com solução TBS-T a 0,5%, durante 1 hora.

3.4.2.5. Revelação das membranas

Por fim, as membranas foram incubadas com o reagente *Enhanced Chemiluminescence* (ECL), utilizando o *Western blotting detection kit* (Advansta, EUA) numa proporção de 1:1, e reveladas num sistema de deteção de luminescência VersaDoc® (Bio-Rad, EUA), com o auxílio do software informático *Quantity One* (BioRad, EUA).

Posteriormente, a quantificação das bandas obtidas foi realizada através do *software* Image Quant® 5.0 (Molecular Dynamics, EUA).

Tabela 1 - Constituição das diversas soluções utilizadas em *Western Blotting*.

Tampão de lise, pH=7,7	Tampão de desnaturação (2x) pH=6,8
0,25M Tris-HCl; 150mM NaCl; 1% Triton-X-100; 0,5% SDS; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 20mM NaF; 2mM Na ₃ VO ₄ ; 10mM β-glicerofosfato; 2,5 mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF; 40μL de cocktail inibidor de proteases/g de tecido (Sigma, EUA).	62,5mM Tris-HCl; 10% Glicerol; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 0,01% Azul bromofenol.
Tampão <i>Resolving</i> (2x), pH=8,8	Tampão <i>Stacking</i> (2x), pH=6,8
0,75M Tris-HCl; 0,2% SDS.	0,25M Tris-HCl; 0,2% SDS.
Tampão de corrida, pH=8,8	Tampão de transferência, pH=11
125mM Tris-HCl; 480mM Glicina; 1% SDS.	50mM CAPS; 2% NaOH; 10% Metanol.
Solução TBS-T e BSA, pH=7,6	Tampão de lavagem, pH=7,6
25mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 1% Tween20; 5% BSA.	25mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 5% Tween20

Tris, tris(hidroximetil)aminometano; HCl, ácido clorídrico; SDS, dodecil sulfato de sódio; NaCl, Cloreto de sódio; EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético; EGTA, ácido tetra-acético etileno de glicol; NaF, fluoreto de sódio; Na₃VO₄, Ortovanadato de sódio; PMSF, fluoreto de fenilmetilsulfonilfluor; CAPS, ácido ciclohexilamina propanosulfônico; NaOH, hidróxido de sódio; TBS-T, Solução de Tris tamponada com Tween 20; BSA, *Bovine Serum Albumin*.

3.5. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita através do programa informático *IBM SPSS Statistics Base 24.0*. Foi realizado um teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. Este teste foi escolhido uma vez que, o número de amostras por grupo é muito pequeno, inferior à distribuição normal (curva de Gauss).

Todos os resultados são apresentados com média \pm erro padrão da média, e onde $p < 0,05$ é considerado valor estatisticamente significativo.

CAPÍTULO 4

Resultados

Capítulo 4. Resultados

4.1. Monitorização do peso e da ração

Como avaliamos diferentes grupos de ratos, uns mantidos com dieta normal, W_SD e GK_SD, e outros alimentados com dieta A03 modificada, enriquecida com gordura e sacarose (hipercalórica), GK_HFD, GK_HFD_Dn e GK_HFD_Sh, foi necessário monitorizar tanto o peso como a ração ingerida, de modo a ter-se uma perceção geral da evolução de cada grupo. É de salientar que apesar destas monitorizações terem sido feitas durante todo o período experimental (descrito na secção 3.3.1.), apenas foram considerados os valores entre a 20^a-23^a semana de vida, de modo a comparar principalmente a evolução dos grupos GK_HFD_Dn e GK_HFD_Sh, após as cirurgias, com os restantes grupos. Desta forma, avaliou-se a ração ingerida (g/rato/dia), ingestão calórica (kcal/rato/dia) e a percentagem de ganho de peso (%) nos diferentes grupos.

Os resultados obtidos mostram que a realização da cirurgia de desnervação do corpo carotídeo no grupo GK_HFD_Dn conduziu a uma diminuição estatisticamente significativa tanto da ração ingerida como da ingestão calórica associada, em relação aos grupos controlos diabéticos, não hiperlipidémico (GK_SD) e hiperlipidémico (GK_HFD), respetivamente ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$), e ao grupo controlo não diabético (W_SD), embora este último não seja estatisticamente significativo. É de salientar que também existe uma diminuição, embora não significativa, da ração ingerida assim como da ingestão calórica no grupo GK_HFD_Sh, grupo diabético hiperlipidémico sujeitos à cirurgia *sham*, em relação aos grupos controlo. Sugerindo um efeito das intervenções cirúrgicas no consumo de ração (tabela 2).

No mesmo grupo (GK_HFD_Dn), acerca da percentagem de ganho de peso, observou-se diferenças estatísticas significativas em relação a todos outros grupos. Desta forma, os resultados obtidos mostraram uma redução estatisticamente significativa da percentagem de ganho de peso no grupo submetido à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, em comparação a todos os grupos controlo, W_SD ($p < 0,001$), GK_SD ($p < 0,05$) e GK_HFD ($p < 0,01$), assim como em relação ao grupo GK_HFD_Sh ($p < 0,05$). É de salientar que a diminuição da percentagem de ganho de peso é maior em relação aos grupos controlo W_SD e GK_HFD, que em relação os grupos GK_SD e GK_HFD_Sh. Tais factos podem ser explicados pelas diferenças de estirpes e de alimentação. No grupo GK_HFD_Sh também existe uma diminuição, embora não estatisticamente significativa, da percentagem de ganho de peso em relação a todos os grupos controlos. Sugerindo assim, um efeito das intervenções cirúrgicas no ganho de peso corporal (tabela 2).

Também foi registado o peso corporal (g) e o peso do TAE (g), medidos no dia do sacrifício, em jejum noturno (18 horas). Relativamente ao TAE, a avaliação do seu peso torna-se importante, uma vez que foi o órgão processado para a realização de análises bioquímicas por *Western Blotting* e porque permite uma avaliação da gordura visceral em todos os grupos de ratos. Os resultados obtidos mostram não haver diferenças estatisticamente significativas peso do TAE entre os grupos estudados. No entanto, analisando os valores presentes na tabela 2, observa-se que o peso é relativamente semelhante entre os grupos W_SD, GK_HFD, GK_HFD_Dn e GK_HFD_Sh, mostrando que ambas as cirurgias não diminuíram o peso deste órgão, tal não era de esperar, principalmente no grupo sujeito à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo. Não sendo estes resultados concordantes com a diminuição de valores da ração ingerida, ingestão calórica associada e percentagem de ganho peso. Para além disso, é de notar

que o grupo controlo diabético não hiperlipidémico apresenta o peso mais baixo do TAE, uma vez que este grupo não é sujeito à dieta hipercalórica.

Acerca do peso corporal nos diferentes grupos, os resultados mostram apenas diferenças estatisticamente significativas nos grupos GK_SD e GK_HFD, ambos com os valores de ($p < 0,01$), em relação ao grupo W_SD, o que resulta da diferença entre estirpes. É de salientar que, neste parâmetro, não houve diferenças estatísticas significativas no grupo GK_HFD_Dn em relação aos restantes grupos. No entanto, este grupo apresenta um peso corporal maior que os controlos diabéticos, apesar da baixa percentagem de ganho de peso. O grupo GK_HFD apresenta apenas um ligeiro aumento do peso corporal em relação ao GK_SD, tal não era de esperar, pois este grupo foi suplementado com dieta enriquecida em gordura e sacarose, devendo apresentar maior peso corporal. A explicação para estes resultados pode dever-se à divisão aleatória dos ratos do grupo GK_HFD em 3 grupos à 20ª semana de vida.

Tabela 2 - Ração ingerida, ingestão calórica e percentagem do ganho de peso entre a 20^a-23^a semana de vida nos diferentes grupos; Peso corporal e peso do TAE, em jejum noturno, antes do sacrifício.

Grupos	W_SD	GK_SD	GK_HFD	GK_HFD_Dn	GK_HFD_Sh
Ração ingerida (g/rato/dia)	21,6 ± 0,0	21,6 ± 0,7	22,2 ± 1,3	18,0 ± 0,5 ###	19,0 ± 0,5
Ingestão calórica (Kcal/rato/dia)	61,0 ± 0,0	61,1 ± 2,0	62,8 ± 3,5	51,0 ± 1,6 ###	53,9 ± 1,5
% Ganho de peso	5,0 ± 0,7	1,7 ± 0,8	2,8 ± 1,4	-3,3 ± 0,6 ***###&	1,5 ± 2,5
Peso TAE (g)	5,6 ± 0,7	3,7 ± 0,2	4,5 ± 0,4	5,0 ± 0,6	5,2 ± 0,8
Peso corporal (g)	441,3 ± 11,1	385 ± 7,8 **	396,0 ± 7,3 **	419,9 ± 8,2	404,2 ± 17,8

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4^a e a 23^a semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4^a e a 23^a semana de vida e sujeito a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, à 20^a semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4^a e a 23^a semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20^a semana de vida.

Dados apresentados como media ± epm, n=5-10/grupo.

* vs W_SD; # vs GK_SD; \$ vs GK_HFD; vs & GK_HFD_Sh.

1 símbolo p < 0,05; 2 símbolos p < 0,01; 3 símbolos p < 0,001.

4.2. Sensibilidade à insulina

4.2.1. Glicemia em jejum, insulinemia, HOMA e níveis plasmáticos de glucagina

Como os grupos estudados incluem modelos animais com DMII, apresentando hiperglicemia moderadas (GK), foi necessário uma avaliação da sensibilidade à insulina, de modo a comparar com o grupo W_SD, modelo animal não diabético. Para além disso, estão envolvidas neste trabalho dois tipos de dietas diferentes que podem influenciar esta condição, assim como também é essencial avaliar o efeito da cirurgia de desnervação do corpo carotídeo na melhoria da sensibilidade à insulina bem como na resistência periférica à mesma. Deste modo, antes de se iniciar a PTI, antes do sacrifício, mediu-se a glicemia após jejum de 6 horas (descrito na secção 3.3.3.), seguida da recolha de sangue da cauda (descrito na secção 3.3.4.), que permitiu avaliar os níveis plasmáticos de insulina, insulinemia ($\mu\text{mol/L}$), e de glucagina ($\mu\text{g/mL}$), ambos obtidos por *kit's* de ELISA (descrito nas secções 3.3.5 e 3.3.7). Para além disso, com os resultados obtidos dos níveis plasmáticos de insulina e com a recolha dos valores da glicose após jejum 6 horas foi possível determinar o índice de insulino-resistência – HOMA (descrito na secção 3.3.6), permitindo avaliar a resistência periférica à insulina nos diferentes grupos.

Relativamente à glicemia após jejum de 6 horas, os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos GK em relação ao grupo W_SD. Ou seja, os resultados mostram um agravamento estatisticamente significativo das glicemias dos grupos GK_SD ($p < 0,05$), GK_HFD ($p < 0,001$), GK_HFD_Dn ($p < 0,05$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,001$) em relação ao grupo W_SD, qual facto é explicado porque estes grupos pertencem a uma estirpe diabética que apresenta normalmente

valores de glicemias mais elevados. Para além disso, observa-se também um agravamento estatisticamente significativo das glicemias do grupo GK_HFD ($p < 0,05$), em relação ao grupo GK_SD, uma vez que o grupo GK_HFD é alimentado com dieta hipercalórica, sendo esta dieta responsável por estas diferenças. É de salientar que o grupo GK_HFD_Dn, apesar de mostrar apenas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo W_SD ($p < 0,05$), apresenta valores de glicemia mais baixos que os restantes grupos GK alimentados pela dieta hipercalórica, exibindo valores próximos do grupo GK_SD, alimentado com dieta normal. Estes resultados comprovam uma melhoria da glicemia em jejum, demonstrando que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo melhora esta condição (Figura 11A).

Relativamente aos resultados obtidos da insulinemia, apenas mostram uma diferença estatisticamente significativa no grupo GK_HFD_Sh em relação ao grupo GK_SD e GK_HFD, ambos com os valores de ($p < 0,05$). No grupo GK_HFD_Dn apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas, observa-se um aumento do nível plasmático de insulina em relação aos grupos controlo, W_SD, GK_SD e GK_HFD (Figura 11B).

Analisando o parâmetro HOMA, os resultados mostram um aumento estatisticamente significativo deste índice nos grupos GK_HFD ($p < 0,01$), GK_HFD_Dn ($p < 0,05$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,01$) em relação ao grupo W_SD, mostrando um agravamento da insulino-resistência dos grupos GK diabéticos hiperlipidémicos em relação ao grupo controlo não diabético. Para além disso, houve também diferenças estatísticas significativas dos grupos GK_HFD e GK_HFD_Sh em relação ao grupo GK_SD, ambos os valores ($p < 0,01$), mostrando um agravamento da insulino-resistência nestes dois grupos em relação ao grupo controlo diabético não hiperlipidémico, em resultado do consumo da dieta hipercalórica nestes grupos. Em relação ao grupo

GK_HFD_Dn, apenas se observa um aumento de insulino-resistência estatisticamente significativo em relação ao grupo W_SD, mas há uma diminuição embora não significativa em relação aos outros grupos mantidos com a dieta hipercalórica, mostrando que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo melhora a sensibilidade à insulina (Figura 11C).

Por último, analisando os resultados referentes aos níveis plasmáticos de glucagonina, estes mostram não haver diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos (Figura 11D).

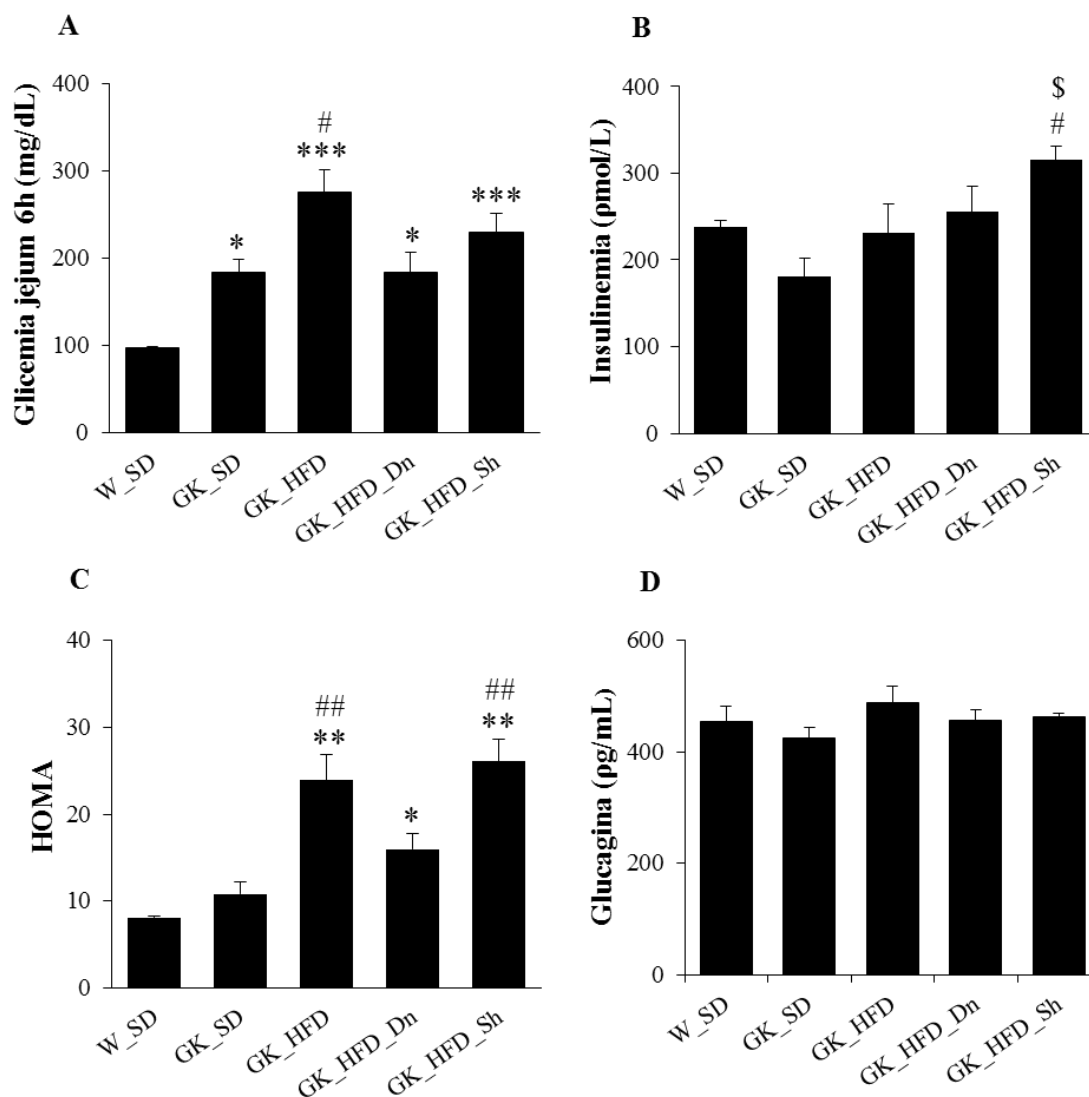


Figura 11 - A. Glicemia após jejum de 6 horas, B. Insulinemia, C. Índice de insulino-resistência-HOMA e D. Níveis plasmáticos de glucagon, todos os parâmetros foram medidos antes do sacrifício.

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, à 20ª semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20ª semana de vida.

Dados apresentados como média ± epm, n=5-10/grupo.

* vs W_SD; # vs GK_SD; \$ vs GK_HFD.

1 símbolo p < 0,05; 2 símbolos p < 0,01; 3 símbolos p < 0,001.

4.2.2. Prova de tolerância à insulina

Para uma avaliação mais rigorosa da sensibilidade à insulina foi essencial a realização da PTI, antes do sacrifício (descrito na secção 3.3.3.), sendo possível avaliar através desta, a AUC e a glicemia 2 horas (mg/dL) após a administração i.p. de insulina.

Em relação aos resultados obtidos na AUC, estes mostram diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos de rato diabéticos, ou seja, GK_SD ($p < 0,05$), GK_HFD ($p < 0,001$), GK_HFD_Dn ($p < 0,01$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,001$), em relação ao grupo de ratos W_SD. Houve também diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GK_HFD ($p < 0,01$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,05$) em relação ao grupo GK_SD, demonstrando que o grupo controlo diabético hiperlipidémico e o grupo diabético hiperlipidémico *sham*, apresentam valores mais elevados da AUC que o grupo controlo diabético não hiperlipidémico, tal facto deve-se à dieta hipercalórica. O grupo GK_HFD_Dn apenas apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo W_SD, no entanto mostra valores mais baixos de AUC que o grupo controlo GK_HFD, apresentando valores mais próximos do grupo GK_SD, comprovando uma melhoria da sensibilidade em insulina neste grupo. (Figura 12A).

Por fim, acerca da glicemia 2 horas após a administração i.p. de insulina, os resultados vieram comprovar mais uma vez o que foi referido anteriormente, mostrando um agravamento estatisticamente significativo de glicemias nos grupos GK_HFD ($p < 0,001$), GK_HFD_Dn ($p < 0,05$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,001$), em relação ao grupo W_SD, assim como um agravamento estatisticamente significativo de glicemias entre o grupo GK_HFD ($p < 0,01$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,05$) em relação ao grupo GK_SD. Mais uma vez observa-se que no grupo GK_HFD_Dn o aumento da glicemia às 2 horas em relação ao grupo W_SD é inferior ao observado nos restantes grupos mantidos com

dieta hipercalórica, mostrando que este grupo apresenta uma ligeira melhoria da sensibilidade à insulina (Figura 12B).

É de salientar que os resultados obtidos na PTI, ou seja, da AUC e da glicemia 2 horas após administração i.p. de insulina, foram concordantes com os resultados obtidos da glicemia após jejum de 6 horas, insulinemia e HOMA nos diferentes grupos em estudo. Sendo principalmente estes resultados concordantes para o grupo GK_HFD_Dn, demonstrando na globalidade uma melhoria da sensibilidade à insulina periférica e do perfil glicémico.

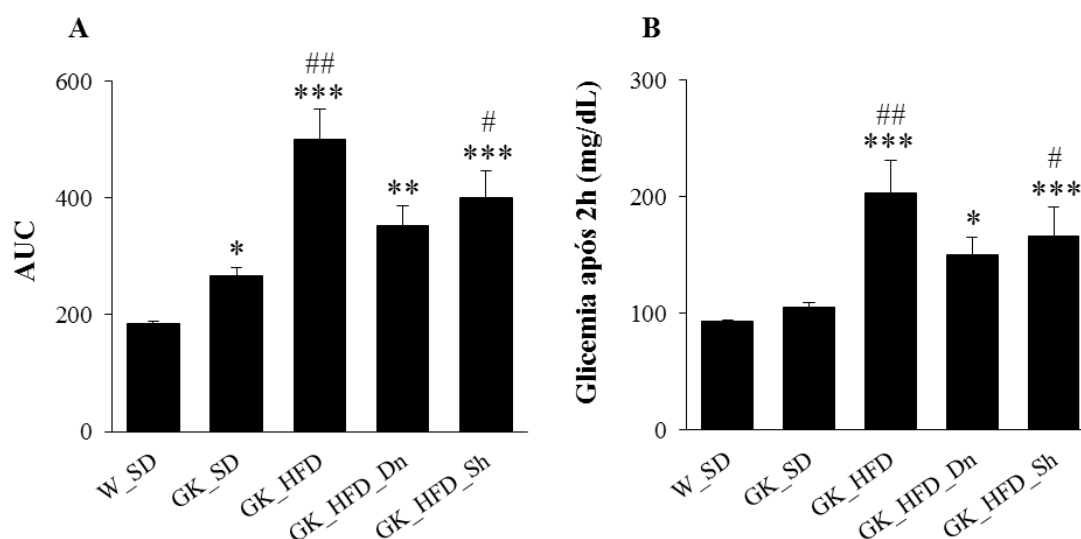


Figura 12 - A. Área debaixo da curva (Area Under the Curve – AUC) e B. Glicemia após 2 horas da administração de insulina, PTI, antes do sacrifício.

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia de deservação do corpo carotídeo, à 20ª semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20ª semana de vida.

Dados apresentados como media ± epm, n=5-10/grupo.

* vs W_SD; # vs GK_SD.

1 símbolo p < 0,05; 2 símbolos p < 0,01; 3 símbolos p < 0,001.

4.2.3. Sinalização da insulina no TAE

Após uma análise sistémica da sensibilidade à insulina nos diferentes grupos em estudo, foi necessário uma avaliação bioquímica de recetores e proteínas no TAE por *Western Blotting*, neste caso de proteínas envolvidas na sinalização da insulina, como o IR e o GLUT-4. Para tal, foi avaliado o IR na sua forma total, IR na sua forma fosforilada (IR-Tyr1361) e o GLUT-4 na sua forma total.

Os resultados obtidos tanto para o IR na sua forma total assim como da sua forma fosforilada (IR-Tyr1361) mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos em estudo. Tal facto pode dever-se à análise bioquímica por *Western Blotting*, ter sido realizada em TAE de animais sacrificados após jejum noturno (18 horas) (Figura 13A).

Em relação ao GLUT-4, os resultados obtidos mostram que também não existem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos em estudo (Figura 13B).

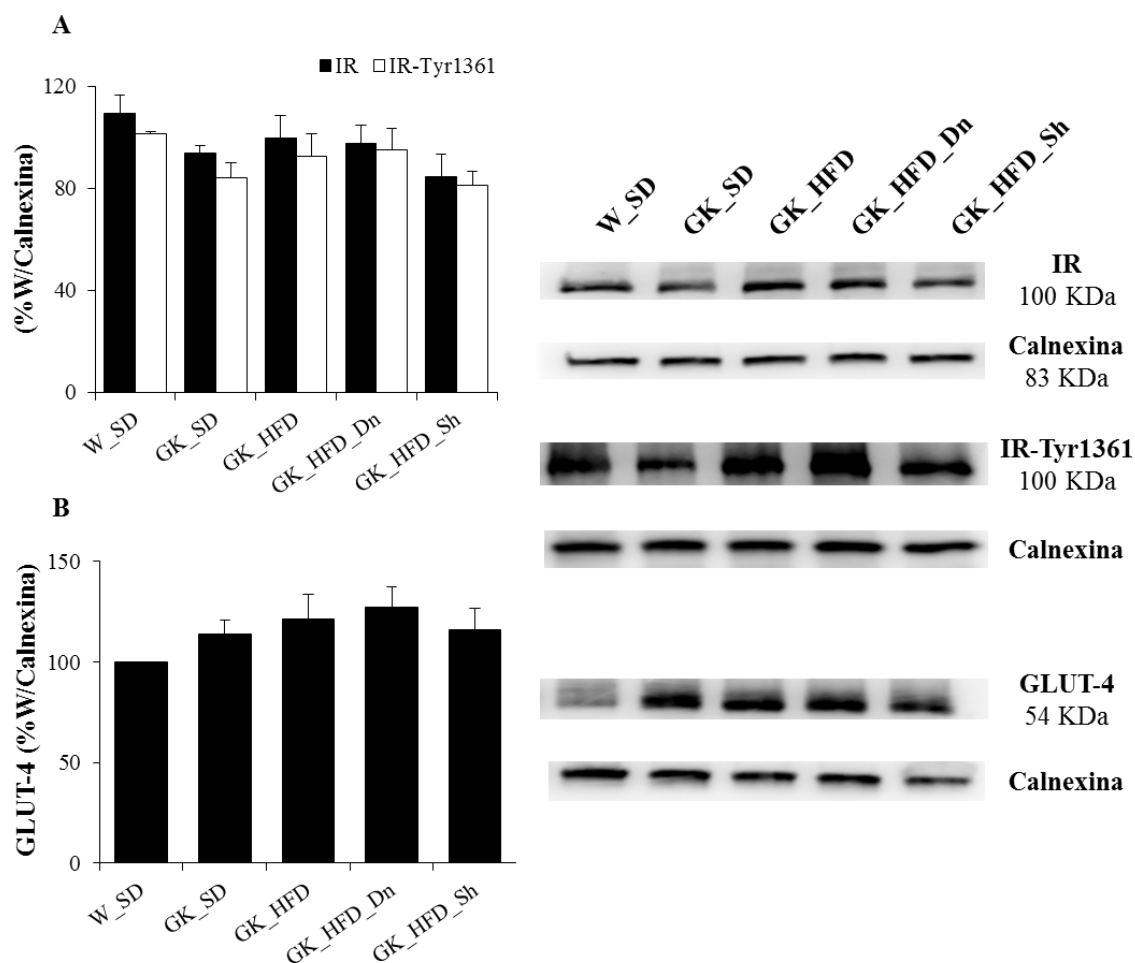


Figura 13 - A. Análise por *Western Blotting* do IR na forma total e do IR na sua forma fosforilada (IR-Tyr1361) e B. Análise por *Western Blotting* do transportador de glucose tipo 4 na sua forma total (GLUT-4).

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, à 20ª semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20ª semana de vida.

Dados apresentados como $media \pm epm$, $n=5-10/grupo$.

4.3. Avaliação do metabolismo lipídico

4.3.1. Níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol

Uma vez analisada a sensibilidade à insulina nos diferentes grupos, foi igualmente necessário avaliar o perfil do metabolismo lipídico, particularmente os níveis plasmáticos de triglicerídeos (mg/dL) e de colesterol (mg/dL), antes do sacrifício (descrito na secção 3.3.4).

Desta forma, em relação aos níveis plasmáticos de triglicerídeos os resultados obtidos mostram diferenças estatisticamente significativas nos grupos GK_HFD ($p < 0,01$), GK_HFD_Dn ($p < 0,05$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,001$) em relação ao grupo W_SD e GK_SD. Desta forma, os resultados obtidos mostram um aumento do nível plasmático de triglicerídeos nos grupos GK mantidos com uma dieta hipercalórica, em relação aos grupos W_SD e GK_SD. No entanto, é possível observar que o aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos no grupo GK_HFD_Dn, em relação aos grupos W_SD e GK_SD é menor, sugerindo que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo melhorou o metabolismo lipídico deste grupo (Figura 14A).

Acerca dos níveis plasmáticos do colesterol, observou-se diferenças estatisticamente significativas dos grupos GK_SD e GK_HFD em relação ao W_SD, ambos com valores de ($p < 0,05$), mostrando um aumento dos níveis plasmáticos de colesterol no grupo GK_HFD e uma diminuição no grupo GK_SD, em relação ao W_SD. Verificou-se também um aumento nos grupos GK_HFD ($p < 0,001$), GK_HFD_Dn ($p < 0,001$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,05$) ou seja, um aumento dos níveis plasmáticos de colesterol, em relação ao grupo GK_SD (Figura 14B).

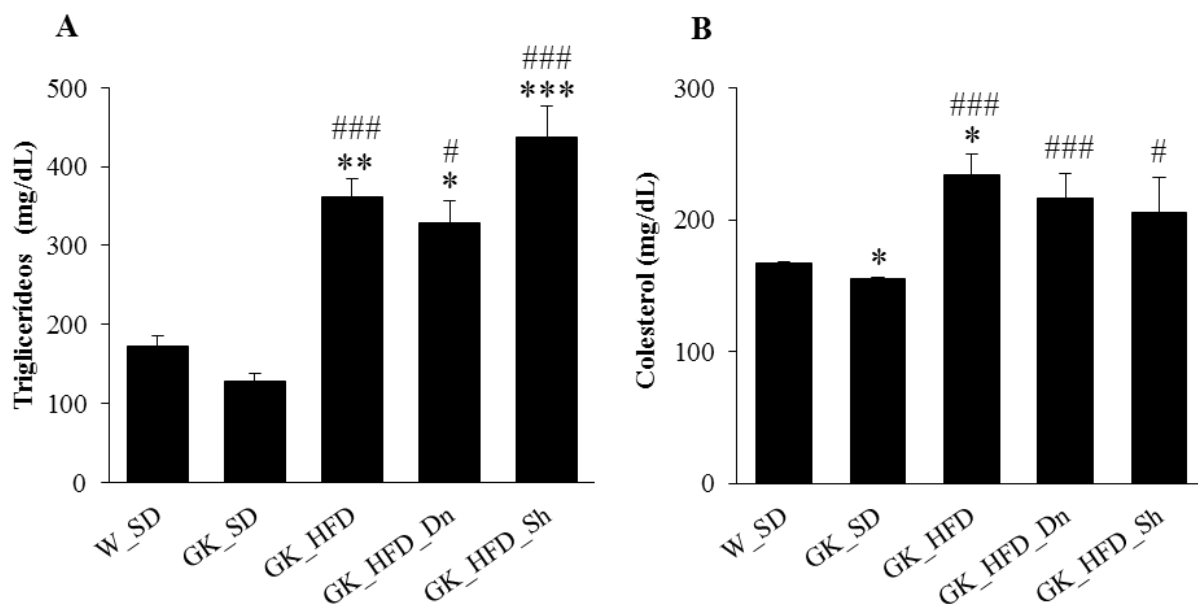


Figura 14 - A. Níveis plasmáticos de triglicerídeos e B. Níveis plasmáticos de Colesterol, antes do sacrifício.

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia de deservação do corpo carotídeo, à 20ª semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20ª semana de vida.

Dados apresentados como média \pm epm, n=5-10/grupo.

* vs W_SD; # vs GK_SD.

1 símbolo p < 0,05; 2 símbolos p < 0,01; 3 símbolos p < 0,001.

4.3.2. Mecanismos de oxidação, síntese e armazenamento de ácidos gordos no TAE

Após uma análise sistémica do metabolismo lipídico em todos os grupos, foi necessário uma avaliação bioquímica de proteínas envolvidas neste metabolismo no TAE por *Western Blotting*. Neste caso, a avaliação de marcadores responsáveis por mecanismos de oxidação de ácidos gordos como a AMPK, PGC-1 α e UCP-1, enzimas responsáveis pela síntese dos mesmos, a ACC e FAS, e por fim o PPAR- γ , responsável pelo armazenamento lípico.

Análise da AMPK na sua forma total e fosforilada (AMPK-Thr172), da ACC na sua forma total e fosforilada (ACC-Ser79) e FAS na sua forma total: Os resultados obtidos para a AMPK na sua forma total mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos em estudo (Figura 15A). No entanto, em relação aos resultados para a sua forma fosforilada (AMPK-Thr172), estes mostram haver diferenças estatisticamente significativas no grupo GK_HFD_Dn em relação a todos grupos. Ou seja, há um aumento significativo dos níveis de expressão de AMPK-Thr172, mostrando que esta enzima está ativada no grupo sujeito à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo em relação ao grupo W_SD ($p < 0,01$), GK_SD ($p < 0,05$), GK_HFD ($p < 0,05$) e GK_HFD_Sh ($p < 0,05$). Estes resultados sugerem uma ativação do processo de oxidação de ácidos gordos neste grupo (Figura 15A).

Acerca da proteína ACC na sua forma total e na sua forma fosforilada (ACC-Ser79), os resultados mostram não haver diferenças estatísticas significativas entre os diferentes. Tais resultados não são concordantes com os resultados da AMPK-Thr172, uma vez que esta enzima inibe a ACC-Ser79 e tal não se verificou (Figura 15B).

Por fim, em relação aos resultados obtidos para a enzima FAS na sua forma total, mostram não haver diferenças significativas entre os diferentes grupos (Figura 15C).

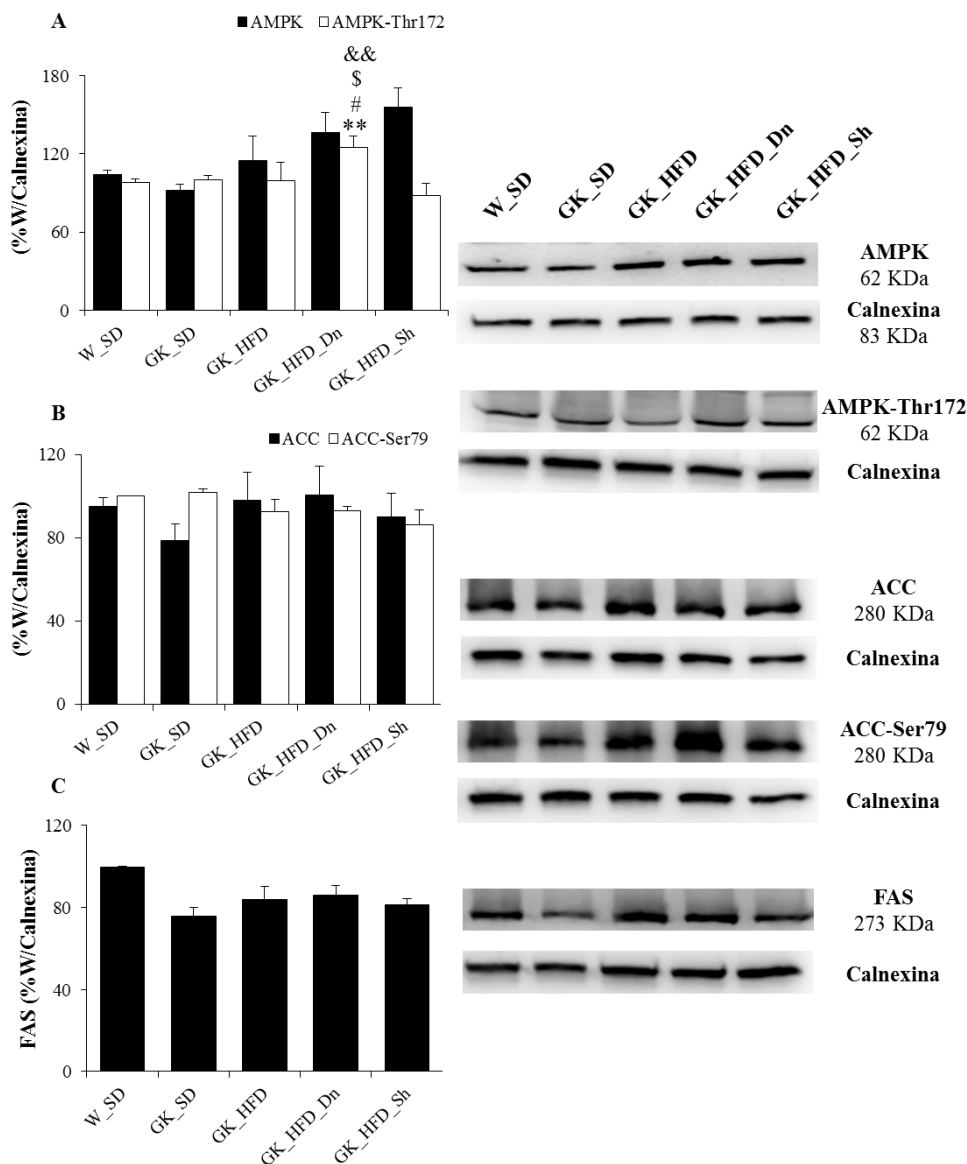


Figura 15 - A. Análise por *Western Blotting* da AMPK na forma total e da AMPK na forma fosforilada (AMPK-Thr172), B. Análise por *Western Blotting* da ACC na forma total e da ACC forma fosforilada (ACC-Ser79) e C. Análise por *Western Blotting* da FAS na forma total.

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, à 20ª semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20ª semana de vida.

Dados apresentados como media \pm epm, n=5-10/grupo.

* vs W_SD; # vs GK_SD, \$ vs GK_HFD e & vs GK_HFD_Sh.

1 símbolo p < 0,05; 2 símbolos p < 0,01; 3 símbolos p < 0,001.

Análise do PGC-1 α e da UCP-1 ambos na sua forma total: Os resultados obtidos para parâmetro PGC-1 α mostram não haver diferenças estatisticamente significativas entres os diferentes grupos em estudo (Figura 16A). O mesmo se observou para a proteína UCP-1, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 16B).

Análise do PPAR- γ na sua forma total: Os resultados obtidos para o PPAR- γ na sua forma total mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos em estudo. No entanto, analisando o gráfico, observa-se que há uma diminuição tendencial, da expressão de PPAR- γ no grupo controlo GK_HFD. Tal fato é de esperar uma vez que este grupo é diabético e hiperlipidémico, estando comprometida a atividade deste recetor nuclear nestas condições. Contudo, é de salientar que no grupo GK_HFD_Dn esta diminuição é atenuada sugerindo que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo pode melhorar o armazenamento lipídico, apresentando valores próximos aos do grupo GK_SD. Estes resultados mostram-se concordantes com os valores obtidos para a AMPK-Thr172 (Figura 16C).

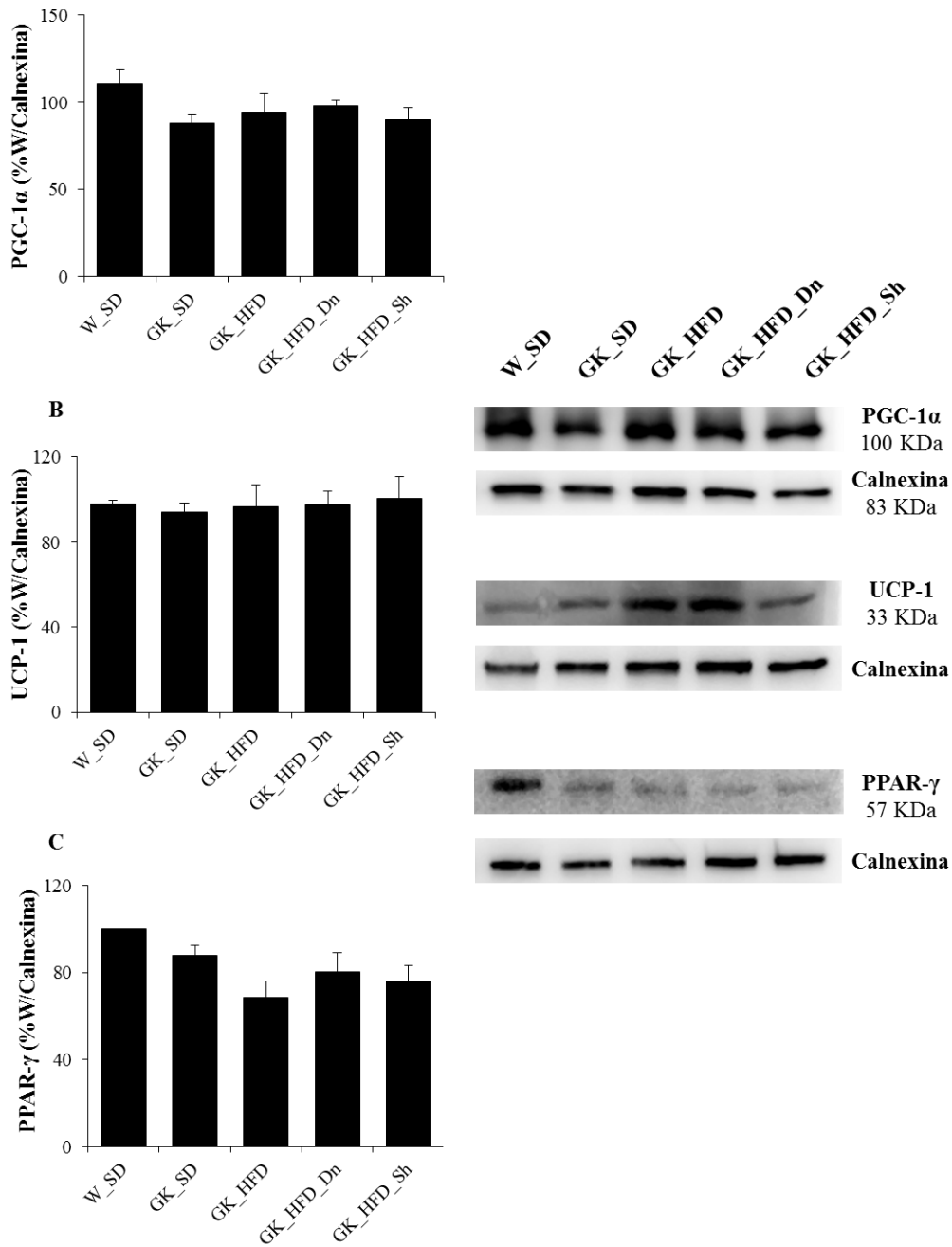


Figura 16 - A. Análise por Western Blotting da PGC-1 α na forma total, B. Análise por Western Blotting da UCP-1 na forma total e C. Análise por Western Blotting do PPAR- γ na forma total.

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4^a e a 23^a semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4^a e a 23^a semana de vida e sujeito a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, à 20^a semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4^a e a 23^a semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20^a semana de vida.

Dados apresentados como media \pm epm, n=5-10/grupo.

4.4. Sinalização dopaminérgica e adrenérgica no TAE

Após uma análise detalhada sobre a sensibilidade à insulina, do metabolismo e armazenamento lipídico nos diferentes grupos, tornou-se necessário uma avaliação bioquímica dos recetores dopaminérgicos e adrenérgicos presentes na superfície da membrana plasmática do TAE por *Western Blotting*, pois sabe-se que as catecolaminas são libertadas pelo corpo carotídeo e que desempenham um papel importante na regulação deste tecido. Podendo estimular ou inibir a lipólise, uma vez que o tecido adiposo possui enervações do SNS e recetores de catecolaminas na sua superfície.

Os resultados obtidos para o D1R na sua forma total, mostram uma diferença estatística significativa, ou seja, um aumento da expressão dos D1R na sua forma total, no grupo sujeito à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo ($p < 0,05$) em relação ao grupo sujeito à cirurgia *sham*. E este último uma diminuição em relação ao grupo controlo não diabético, ($p < 0,01$). Apesar de não ser estatisticamente significativo é de salientar que há também um aumento da expressão do D1R na sua forma total no grupo GK_HF_Dn em relação ao grupo controlo GK_HFD, mostrando que no grupo sujeito à cirurgia de desnervação há uma maior atividade destes recetores, em relação ao grupo controlo diabético hiperlipidémico (Figura 17A).

Relativamente ao D2R na sua forma total, os resultados mostram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos. No entanto, parece haver um aumento da expressão destes recetores no grupo GK_HFD_Dn, em relação a todos os grupos de ratos diabéticos (Figura 17B).

Por fim, analisando os resultados para $\beta 3$ -AR na sua forma total, observa-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos em estudo, sugerindo que o SNS poderá não estar envolvido na modulação da função do tecido adiposo após a desnervação do corpo carotídeo (Figura 17C).

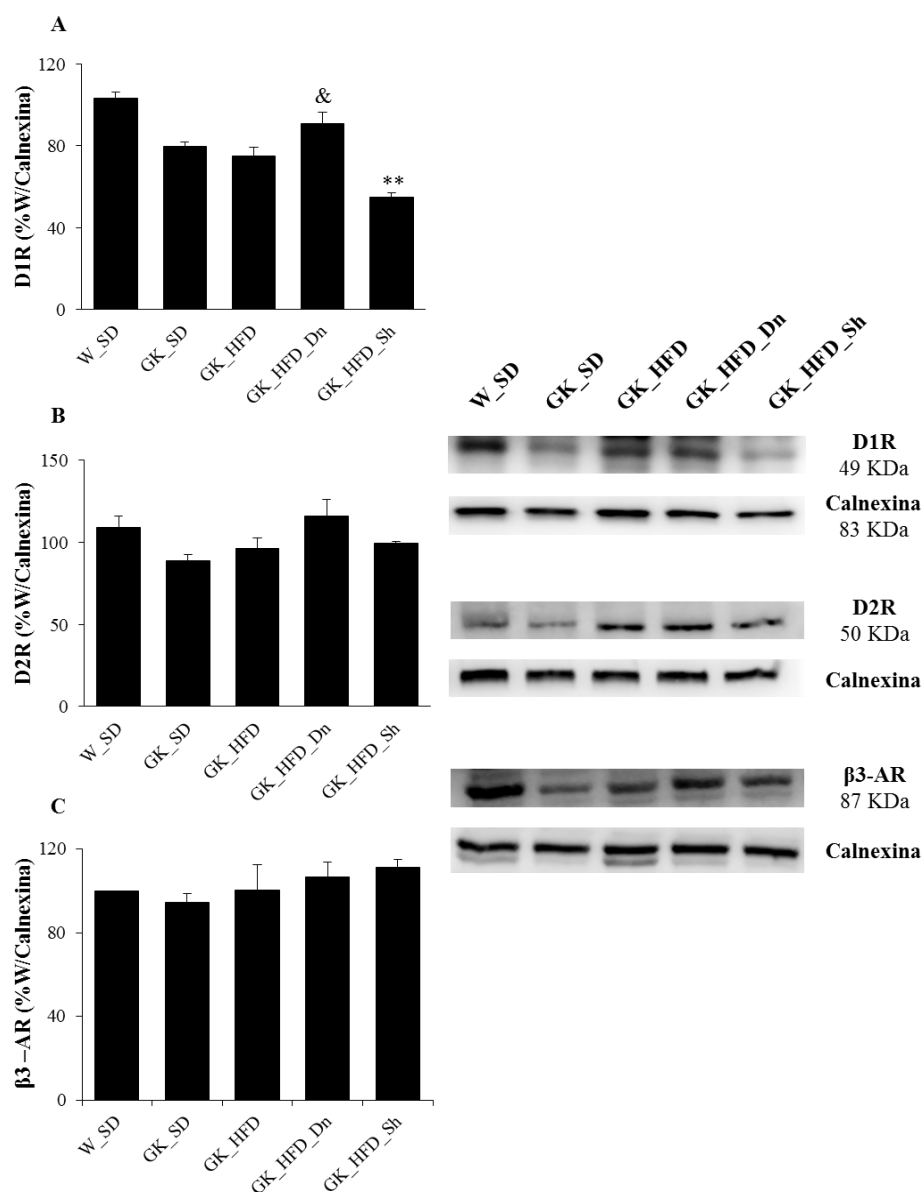


Figura 17 - A. Análise por *Western Blotting* do D1R na forma total, B. Análise por *Western Blotting* do D2R na forma total e C. Análise por *Western Blotting* do beta3-AR na sua forma total.

W_SD – ratos *Wistar* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_SD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta normal (*standard diet* A03) durante as 23 semanas de vida, GK_HFD – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida, GK_HFD_Dn – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia de deservação do corpo carotídeo, à 20ª semana de vida e GK_HFD_Sh – ratos *Goto-kakizaki* mantidos com dieta A03 modificada, enriquecida em gordura e sacarose, entre 4ª e a 23ª semana de vida e sujeito a cirurgia *sham*, à 20ª semana de vida.

Dados apresentados como média ± epm, n=5-10/grupo.

* vs W_SD e & vs GK_HFD_Sh.

1 símbolo p < 0,05; 2 símbolos p < 0,01; 3 símbolos p < 0,001.

CAPÍTULO 5

Discussão

Capítulo 5. Discussão

A SM é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de um variado conjunto de distúrbios metabólicos que podem levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dislipidemia, hipertensão arterial crónica, obesidade e DMTII (Azhar, 2010; Grundy, 2015; Lopez-candales et al., 2017; Smith & Ryckman, 2015; Tellechea et al., 2017). A DMTII é uma das doenças mais ameaçadoras do século XXI, uma vez que é considerada uma das maiores causas de mortalidade e morbidade, estando a sua incidência a aumentar globalmente e de forma preocupante (Golay & Ybarra, 2005; Zang et al., 2017; Messina et al., 2017). Esta doença caracteriza-se pela tolerância diminuída à glicose e o aumento da resistência à insulina nos tecidos sensíveis à sua ação, como fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo. No tecido adiposo este estado de insulino-resistência desenvolve-se com excessiva acumulação de AGLs, no citoplasma, ocorrendo hipertrofia do adipócito e o desenvolvimento de um processo de inflamação crónica de baixo grau (Guilherme et al., 2008; Hosogai et al., 2007; Matafome et al., 2014; Matafome et al., 2015).

Recentemente, o corpo carotídeo, órgão quimiorreceptor periférico, que tem como função detetar alterações no sangue arterial, foi indicado como potencial órgão da regulação da glicose. Foi demonstrado em vários estudos que, numa situação de hipoglicemia, este órgão é ativado, levando à produção de catecolaminas, como a dopamina (Conde et al., 2006; Conde et al., 2008; Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; García-Fernández et al., 2007; Wehrwein et al., 2010; Zhang et al., 2007). Posteriormente verificou-se a existência da sinalização de insulina neste órgão, que atua de forma preponderante na resposta às baixas concentrações de glicose plasmática (Bin-Jaliah et al., 2004; Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Limberg et al., 2014; Ribeiro et

al., 2013). Desta forma, estes estudos levaram à noção de que o corpo carotídeo poderia estar envolvido na regulação da homeostasia metabólica. Estudos com modelos animais com SM e hiperinsulinêmicos, pelo consumo de dieta hipercalórica, verificaram a disfunção do corpo carotídeo, conduzindo à resistência à insulina periférica, hipertensão, aumento da sinalização simpática e o aumento de catecolaminas no sangue (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2016). No entanto, com a ressecção bilateral crônica do nervo do seio carotídeo este processo parece ser revertido (Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2016). Este trabalho teve como objetivo verificar estas condições anteriormente referidas, ou seja, avaliar a melhoria do perfil metabólico num modelo animal de DMII com hiperlipidemia, através da cirurgia de desnervação do corpo carotídeo. Assim como estudar o seu envolvimento na sensibilidade à insulina e perfil glicémico, bem como nos mecanismos de armazenamento e metabolismo lipídico no tecido adiposo, mais concretamente ao nível do TAE.

Através da avaliação dos resultados obtidos neste trabalho, observa-se que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, em animais diabéticos e hiperlipidémicos, levou a uma diminuição da ração ingerida e da ingestão calórica associada, assim como da percentagem de ganho peso, em relação ao grupo controlo diabético e hiperlipidémico. Para além disso, melhorou a sensibilidade à insulina, pois observa-se uma melhoria dos valores de glicemia em jejum de 6 horas, insulinemia e do índice HOMA, assim como nos resultados obtidos na PTI, com uma melhoria da AUC e uma diminuição dos valores de glicemia 2 horas após administração i.p. de insulina. Embora não se observem alterações do recetor da insulina e do GLUT-4, devido ao fato de os animais se encontrarem em jejum prolongado, é de esperar uma ativação deste recetor e translocação do GLUT-4 para a membrana no período pós-prandial (de acordo com os

resultados da PTI), resultando numa melhoria da sensibilidade à insulina e no aumento da captação de glicose para o interior do adipócito. Estes resultados devem-se essencialmente ao sacrifício destes animais ter sido após um jejum noturno, sendo uma razão para as poucas variações observadas, pois estes resultados seriam diferentes numa situação pós-prandial, como explicado anteriormente, experiências que poderão vir a ser realizados no futuro.

As catecolaminas desempenham um papel importante na regulação do tecido adiposo, sendo um dos principais reguladores da lipólise (Matafome et al., 2015; Nielsen et al., 2014; Vargovic et al., 2011). Numa situação como a obesidade e DMTII, verifica-se um aumento da ativação simpática, associada à hiperinsulinemia, havendo um aumento destas hormonas, contribuindo para o desenvolvimento da resistência à insulina e da tolerância diminuída à glicose (Conde et al., 2014; Huggett et al., 2003; Ribeiro et al., 2013). Estudos anteriores mostram que a desnervação do corpo carotídeo, em modelos animais de SM, leva a uma diminuição desta atividade simpática, levando à diminuição de catecolaminas na corrente sanguínea, permitindo o aumento do gasto energético, a perda de peso, independentemente da indução da dieta hipercalórica, e a melhoria da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, como o tecido adiposo, mostrada pelo aumento da expressão do IR e do GLUT-4 (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2016). A melhoria da sensibilidade à insulina, nestes estudos, foi demonstrada pela diminuição dos valores da PTI, AUC, glicemias e insulinemia em jejum (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2016). Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho, num modelo animal de DMTII com hiperlipidemia, vão ao encontro dos obtidos anteriormente. No entanto, é de salientar que em Ribeiro et al., (2013), os resultados indicam também uma diminuição da gordura visceral, nos animais

submetidos à cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, o que não se verificou neste trabalho.

Nas doenças metabólicas, como a obesidade e conseqüentemente de DMTII, há uma característica desregulação metabólica e insulino-resistência dos tecidos sensíveis à ação da insulina, levando a um aumento plasmático de colesterol e triglicérides, sendo provenientes da disfunção do tecido adiposo (lipólise) e da lipogênese hepática (Caruso et al., 2010; Gesta et al., 2007; Guilherme et al., 2008; Rosen & Spiegelman, 2006; Sacramento et al., 2016). Ao observar os resultados obtidos neste trabalho, a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, em animais diabéticos e hiperlipidêmicos, leva a uma diminuição ligeira dos níveis plasmáticos de triglicéridos em relação ao controle diabético e hiperlipidêmico, mostrando que esta cirurgia promove uma melhoria do perfil lipídico. Desta forma, estes resultados mostram-se concordantes com os resultados da diminuição da ingestão calórica e da diminuição da percentagem de ganho de peso, entre a cirurgia e o sacrifício. Resultados obtidos em estudos anteriores mostram também estas diminuições plasmáticas em modelos animais com SM sujeitos à mesma cirurgia e induzidos com dieta hipercalórica (Ribeiro et al., 2013; Sacramento et al., 2016).

A insulina tem um papel muito importante no TAE, uma vez que a sua sinalização, numa situação pós-prandial, induz a lipogênese e inibe a lipólise, favorecendo o armazenamento dos triglicérides e ativação do GLUT-4, aumentando a captação de glicose (Alghamdi et al., 2014; Beale, 2013; Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015; Ye, 2013). No entanto, em jejum, a lipólise é ativada, promovendo a formação e libertação de três moléculas de ácidos gordos e uma de glicerol para o citoplasma e a ação da insulina é inibida (Caruso et al., 2010; Gesta et al., 2007; Guilherme et al., 2008; Rosen & Spiegelman, 2006). Numa situação de SM,

obesidade e DMII, a ação da insulina também está comprometida neste tecido, dando origem a alterações do metabolismo lipídico, sendo importante uma avaliação de proteínas envolvidas no mecanismo de oxidação de ácidos gordos, como a AMPK, PGC1- α e UCP-1, enzimas responsáveis pela síntese dos mesmos, como a ACC e FAS e por fim o avaliar a ação do recetor PPAR- γ , responsável pelo armazenamento lipídico (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015). Ao observar os resultados obtidos neste trabalho, da cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, em animais diabéticos e hiperlipidémicos, e sabendo que o sacrifício destes animais foi após um jejum noturno, mostra um aumento da atividade da enzima AMPK em relação ao grupo controlo diabético hiperlipidémico. Esta enzima é responsável por promover a oxidação de ácidos gordos, assim como fosforilar e inibir enzimas envolvidas na síntese de ácidos gordos, como a ACC e a FAS. Está também envolvida no processo de degradação do AMPc, levando à inativação do PKA e conseqüentemente da lipólise (Hardie, 2004; Lyons et al., 2016; Matafome et al., 2013; Matafome et al., 2014; Ruderman et al., 2013). Numa situação de resistência à insulina, a expressão desta enzima está diminuída (Lyons et al., 2016; Matafome et al., 2013; Ruderman et al., 2013), demonstrando, desta forma, que este processo cirúrgico realizado num modelo animal diabético e hiperlipidémico reverteu a expressão desta enzima mostrando uma melhoria no perfil lipídico, uma vez que está a ser promovida a oxidação de ácidos gordos e não a lipogénese. Assim seria de esperar uma inibição das enzimas ACC e FAS, levando à diminuição da formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, resultando num aumento de captação e oxidação de ácidos gordos na mitocôndria (ciclo de Krebs) (Hardie, 2004; Lyons et al., 2016; Matafome et al., 2013; Matafome et al., 2014; Ruderman et al., 2013). No entanto, os resultados obtidos não são concordantes, com os resultados do aumento da atividade da AMPK, uma vez que não há um aumento da

ACC-Ser79 (forma inativa) em relação ao controlo diabético hiperlipidémico. O mesmo se verifica para a enzima FAS, sugerindo que está a ocorrer a síntese de ácidos gordos (lipogénese), embora os resultados devam ser analisados com cuidado devido a serem apenas relativos ao período de jejum.

Outro resultado obtido neste trabalho, da cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, em animais diabéticos e hiperlipidémicos, mostram um ligeiro aumento da atividade do recetor PPAR- γ neste grupo em relação ao grupo controlo diabético e hiperlipidémico. Sendo o resultado concordante, uma vez que numa situação de DMII, a disfunção do TAE leva à inibição do PPAR- γ , diminuindo a esterificação lipídica e o armazenamento lipídico, promovendo o aumento de AGLs no citoplasma e a ativação de vários mecanismos inflamatórios (Guilherme et al., 2008; Matafome et al., 2015; Rodrigues et al., 2013; Wellen & Hotamisligil, 2005). Sendo perceptível que este procedimento cirúrgico tenda a melhorar o armazenamento lídico. O PGC-1 α é um coativador da transcrição, estando envolvido numa ampla variedade de repostas biológicas, incluindo o metabolismo, estando o PPAR- γ sujeito à ação deste coativador, aumentando o nível de transcrição dos genes neste recetor, aumentando assim a sua atividade (Liang & Ward, 2006). Deste modo, seria de esperar que a expressão deste coativador também aumentasse, mas os resultados obtidos não o mostraram.

A proteína UCP-1 está presente na cadeia transportadora de eletrões, sendo expressa na membrana interna da mitocôndria, sendo responsável por utilizar a energia derivada da β -oxidação, através da fosforilação não-oxidativa, para produção de calor (Caruso et al., 2010; Guilherme et al., 2008). Estudos anteriores mostram a existência da proteína UCP-1 no tecido adiposo branco, através da estimulação crónica do recetor β -adrenérgico. Quando há uma sobre expressão desta proteína, leva à alteração morfológica de fenótipo de tecido adiposo branco, para tecido adiposo castanho,

processo conhecido como “*browning*”. As células resultantes de tecido adiposo bege, mudam de estado de armazenamento lipídico para um estado de produção de calor. O aumento de expressão da UCP-1 no tecido adiposo branco tem sido sugerido como um mecanismo que previne na obesidade e consequente DMTII (Guerra et al., 1998; Lee et al., 2012; Nagase et al., 1996; Castrejón-Tellez et al., 2016). Embora se tenha verificado uma melhoria do perfil lipídico, não se verificaram alterações nos níveis da proteína UCP-1, o que está de acordo com os resultados observados para a expressão do β 3-AR.

Como já referido, o corpo carotídeo quando ativado liberta neurotransmissores, como a dopamina (Conde et al., 2006; Conde et al., 2008; Conde et al., 2014; Gao et al., 2014; Gonzalez et al., 2014; Ortega-Sáenz et al., 2013). Tornando-se essencial avaliar a ação desta hormona no TAE. Desta forma, este trabalho permitiu observar a expressão de DR (D1R e D2R) no TAE, tal como anteriormente descrito em Borcharding et al., (2011). Os resultados obtidos neste trabalho mostram um aumento da expressão de DR, tanto do D1R como D2R, após a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo, em relação ao grupo controlo diabético e hiperlipidémico. No entanto, estes resultados foram mais evidentes para o recetor D1, onde as diferenças foram mais significativas.

Em relação ao β 3-AR não se verificam alterações entre os diferentes grupos. Apesar da disfunção metabólica acarretar normalmente um aumento da ativação simpática, como referido em Conde et al., 2014; Huggett et al., 2003 e Ribeiro et al., 2013, promovendo a estimulação da lipólise e aumento da concentração plasmática de AGLs, como referido em Matafome et al., 2015; Nielsen et al., 2014 e Vargovic et al., 2011, neste trabalho não se verificam alterações a este nível.

Por fim, é de salientar que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo é uma técnica inovadora nesta área de estudos, no entanto, já que tem sido utilizada no tratamento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão, assim como no tratamento

da insuficiência cardíaca e apneia do sono (Johnson & Limberg, 2014). Deste modo, estudos indicam que este procedimento cirúrgico reduz a atividade simpática e conseqüentemente a pressão arterial em animais hipertensos, melhorando esta condição (Abdala et al., 2012; McBryde et al., 2013; Fujii et al., 2017; McBryde et al., 2017). Assim como parece estar envolvido no tratamento da insuficiência cardíaca, mostrando uma melhoria da ventilação, diminuição da respiração oscilatória e redução de arritmias ventriculares (Johnson & Limberg, 2014; Nakayama et al., 2003; Rio et al., 2013).

CAPÍTULO 6

Conclusões

Capítulo 6. Conclusões

A cirurgia de desnervação do corpo carotídeo promoveu uma melhoria do perfil glicémico, com melhoria da glicemia em jejum, da tolerância à insulina e da insulino-resistência, por diminuição do índice HOMA.

Para além disso, este procedimento cirúrgico, alterou os mecanismos envolvidos no metabolismo lipídico no tecido adiposo, com aumento da atividade da AMPK, uma enzima chave no processo desoxidação dos ácidos gordos, resultando numa diminuição dos níveis plasmáticos de triglicédeos.

Por outro lado, as alterações metabólicas não se correlacionaram com alterações da sinalização adrenérgica, mas verificaram-se alterações da sinalização dopaminérgica no tecido adiposo.

É de concluir que apesar de alguns dos resultados possam ser contraditórios e ainda de difícil interpretação, é necessário salientar que a cirurgia de desnervação do corpo carotídeo é uma técnica inovadora, assim como o envolvimento do corpo carotídeo e da dopamina no controlo da homeostasia metabólica, podendo representar um novo alvo terapêutico para doenças como DM2. Deste modo, são necessários estudos futuros com o objetivo de determinar os mecanismos envolvidos.

CAPÍTULO 7

Referências Bibliográficas

Capítulo 7. Referências Bibliográficas

- Abdala, A. P., McBryde, F. D., Marina, N., Hendy, E. B., Engelman, Z. J., Fudim, M., ... Paton, J. F. R. (2012). Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *The Journal of Physiology*, 590(17), 4269–77;
- Abraham, A. D., Neve, K. A., & Lattal, K. M. (2014). Dopamine and extinction: A convergence of theory with fear and reward circuitry. *Neurobiology of Learning and Memory*, 108, 65–77;
- Alghamdi, F., Guo, M., Abdulkhalek, S., Crawford, N., Amith, S. R., & Szewczuk, M. R. (2014). A novel insulin receptor-signaling platform and its link to insulin resistance and type 2 diabetes. *Cellular Signalling*, 26(6), 1355–1368;
- Association, American Diabetes (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(January), 81–90;
- Azhar, S. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiology*, 6(5), 657–691;
- Baik, J.-H. (2013a). Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB Reports*, 46(11), 519–26;
- Baik, J.-H. (2013b). Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(October), 152;
- Barnes, M. A., Carson, M. J., & Nair, M. G. (2015). Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine*, 72(2), 210–219;
- Beale, E. G. (2013). Insulin signaling and insulin resistance. *Journal of Investigative Medicine*, 61(1), 11–4;

- Bin-Jaliah, I., Maskell, P. D., & Kumar, P. (2004). Indirect sensing of insulin-induced hypoglycaemia by the carotid body in the rat . *The Journal of Physiology*, 556(Pt 1), 255–266;
- Boada, C. C. A. & Martínez-Moreno, J. M. (2013). Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: beyond the duo “insulin resistance-secretion deficit”. *Nutrición Hospitalaria*, 28(2), 78–87;
- Borcherding, D. C., Hugo, E. R., Idelman, G., de Silva, A., Richtand, N. W., Loftus, J., & Ben-Jonathan, N. (2011). Dopamine receptors in human adipocytes: Expression and functions. *PLoS ONE*, 6(9), 1–10;
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2012). Yes, even human brown fat is on fire! *Journal of Clinical Investigation*, 122(2), 486–489;
- Caruso, C., Balistreri, C. R., & Candore, G. (2010). The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation*, 2010;
- Castrejón-Tellez, V., Rodríguez-Pérez, J. M., Pérez-Torres, I., Pérez-Hernández, N., Cruz-Lagunas, A., Guarner-Lans, V., ... Rubio-Ruiz, M. E. (2016). The effect of resveratrol and quercetin treatment on PPAR mediated uncoupling protein (UCP-) 1, 2, and 3 expression in visceral white adipose tissue from metabolic syndrome rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1–13;
- Choi, M. R. (2015). Renal dopaminergic system: Pathophysiological implications and clinical perspectives. *World Journal of Nephrology*, 4(2), 196;

- Conde, S. V., Gonzalez, C., Batuca, J. R., Monteiro, E. C., & Obeso, A. (2008). An antagonistic interaction between A2B adenosine and D2 dopamine receptors modulates the function of rat carotid body chemoreceptor cells. *Journal of Neurochemistry*, *107*(5), 1369–1381;
- Conde, S. V., Obeso, A., Vicario, I., Rigual, R., Rocher, A., & Gonzalez, C. (2006). Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A2A and A2B adenosine receptors. *Journal of Neurochemistry*, *98*(2), 616–628;
- Conde, S. V., Sacramento, J. F., Guarino, M. P., Gonzalez, C., Obeso, A., Diogo, L. N., ... Ribeiro, M. J. (2014). Carotid body, insulin and metabolic diseases: Unravelling the links. *Frontiers in Physiology*, *5*(OCT), 1–14;
- Dalamaga, M. (2014). Resistin as a biomarker linking obesity and inflammation to cancer: potential clinical perspectives. *Biomarkers Medicine*, *8*, 107–118;
- Flierl, M., & Rittirsch, D. (2008). Catecholamines - crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Molecular Medicine*, *14*(3-4),1;
- Fujii, K., Saku, K., Kishi, T., Oga, Y., Tohyama, T., Nishikawa, T., ... Sunagawa, K. (2017). Carotid Body Denervation Markedly Improves Survival in Rats With Hypertensive Heart Failure. *American Journal of Hypertension*, 1–8;
- Gallego-Martin, T., Fernandez-Martinez, S., Rigual, R., Obeso, A., & Gonzalez, C. (2012). Effects of low glucose on carotid body chemoreceptor cell activity studied in cultures of intact organs and in dissociated cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *302*(8), C1128–40;

- Gao, L., Ortega-Sáenz, P., García-Fernández, M., González-Rodríguez, P., Caballero-Eraso, C., & López-Barneo, J. (2014). Glucose sensing by carotid body glomus cells: Potential implications in disease. *Frontiers in Physiology*, 5(OCT), 1–9;
- García-Fernández, M., Ortega-Sáenz, P., Castellano, A., & López-Barneo, J. (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes*, 56(12), 2893–2900;
- Gesta, S., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131(2), 242–256;
- Golay, A., & Ybarra, J. (2005). Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19(4), 649–663;
- Gonzalez, C., Conde, S. V., Gallego-Martín, T., Olea, E., Gonzalez-Obeso, E., Ramirez, M., ... Rocher, A. (2014). Fernando de Castro and the discovery of the arterial chemoreceptors. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(May), 25;
- Grundy, S. M. (2015). Adipose tissue and metabolic syndrome : too much, too little or neither. *European Journal of Clinical Investigation*, 45, 1209–1217;
- Guelho, D., Paiva, I., & Carvalheiro, M. (2013). Diabetes mellitus – um «continuum» fisiopatológico. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes E Metabolismo*, 8(1), 44–49;
- Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K., & Kozak, L. P. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control effects on body weight and adiposity. *Journal of Clinical Investigation*, 102(2), 412–420;

- Guilhaume, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5), 367–377;
- Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science*, 117(23), 5479–5487;
- Harris, R. B. S. (2012). Sympathetic denervation of one white fat depot changes norepinephrine content and turnover in intact white and brown fat depots. *Obesity (Silver Spring)*, 20(7), 1355–1364;
- Heindel, J. J., Newbold, R., & Schug, T. T. (2015). Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*;
- Holmes, A. P., Turner, P. J., Carter, P., Leadbeater, W., Ray, C. J., Hauton, D., ... Kumar, P. (2014). Glycogen metabolism protects against metabolic insult to preserve carotid body function during glucose deprivation. *J Physiology*, 592(592), 4493–450620;
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., ... Shimomura, I. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*, 56(4), 901–911;
- Huggett, R. J., Scott, E. M., Gilbey, S. G., Stoker, J. B., Mackintosh, A. F., & Mary, D. A. S. G. (2003). Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Sympathetic Neural Mechanisms in Hypertension. *Circulation*, 108(25), 3097–3101;
- Iturriaga, R., Del Rio, R., Idiaquez, J., & Somers, V. K. (2016). Carotid body chemoreceptors, sympathetic neural activation, and cardiometabolic disease. *Biological Research*, 49, 13;
- Johnson, B. D., & Limberg, J. K. (2014). Is carotid body denervation the silver bullet for heart failure? *The Journal of Physiology*, 592(Pt 6), 1179–80;

- Kong, A. P. S., Luk, A. O. Y., & Chan, J. C. N. (2016). Detecting people at high risk of type 2 diabetes- How do we find them and who should be treated? *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(3), 345–355;
- Kusminski, C. M., Bickel, P. E., & Scherer, P. E. (2016). Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. *Nature Reviews Drugs Discovery*;
- Lee, J.-Y., Takahashi, N., Yasubuchi, M., Kim, Y.-I., Hashizaki, H., Kim, M.-J., ... Kawada, T. (2012). Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 302(2), C463–72;
- Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*, 30, 145–151;
- Limberg, J.K., Curry, T.B., Prabhakar, N.R. & Joyner, M. J. (2014). Is insulin the new intermittent hypoxia? *Med Hypotheses*, 82(6), 730–735;
- Liu, B., Xu, Y., Voss, C., Qiu, F.-H., Zhao, M.-Z., Liu, Y.-D, ... Wang, Z.-L. (2012). Altered Protein Expression in Gestational Diabetes Mellitus Placentas Provides Insight into Insulin Resistance and Coagulation/Fibrinolysis Pathways. *PLoS ONE*, 7(9), 1–12;
- Lopez-candales, A., Burgos, P. M. H., Hernandez-suarez, D. F., & Harris, D. (2017). Linking chronic inflammation with cardiovascular disease: from normal aging to the metabolic syndrome. *Journal of Nature and Science*;
- Lyons, C. L., Kennedy, E. B., & Roche, H. M. (2016). Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents. *Nutrients*, 8(5);
- Martin, K., Mani, M., & Mani, A. (2015). New targets to treat obesity and the metabolic syndrome. *European Journal of Pharmacology*, 763(0 0), 64–74;

- Matafome, P., Santos-Silva, D., Sena, C. M. & Seça, R. (2013). Common mechanisms of dysfunctional adipose tissue and obesity-related cancers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 29, 285–295;
- Matafome, P., Rodrigues, T., Pereira, A., Letra, L., Azevedo, H., Paixão, A., ... Seça, R. (2014). Long-term globular adiponectin administration improves adipose tissue dysmetabolism in high-fat diet-fed Wistar rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 120(4), 147–57;
- Matafome, P., Rodrigues, T., & Seça, R. (2015). Glycation and Hypoxia : Two Key Factors for Adipose Tissue Dysfunction. *Current Medicinal Chemistry*, 22, 1–21;
- Matafome, P., Santos-Silva, D., Crisóstomo, J., Rodrigues, T., Rodrigues, L., Sena, C. M., ... Seça, R. (2012). Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 118(2), 58–68;
- McBryde, F. D., Abdala, A. P., Hendy, E. B., Pijacka, W., Marvar, P., Moraes, D. J. A., Sobotka, P. A. & Paton, J. F. R. (2013). The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nature Communications*;
- McBryde, F. D., Hart, E. C., Ramchandra, R., & Paton, J. F. R. (2017). Evaluating the carotid bodies and renal nerves as therapeutic targets for hypertension. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 204, 126–130;
- Messina, J., Campbell, S., Morris, R., Eyles, E., & Sanders, C. (2017). A narrative systematic review of factors affecting diabetes prevention in primary care settings. *PLOS ONE*, 1–20;

- Nagase, I., Yoshida, T., Kumamoto, K., Umekawa, T., Sakane, N., Nikami, H., ... Saito, M. (1996). Expression of uncoupling protein in skeletal muscle and white fat of obese mice treated with thermogenic β 3-adrenergic agonist. *Journal of Clinical Investigation*, 97(12), 2898–2904;
- Nakayama, H., Smith, C. A., Rodman, J. R., Skatrud, J. B., & Dempsey, J. A. (2003). Carotid body denervation eliminates apnea in response to transient hypocapnia. *Journal of Applied Physiology*, 94(1), 155–64;
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism*, 293, 444–452;
- Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O. L., Møller, N., & Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: Molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52(3);
- Nurse, C. A. (2014). Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. *The Journal of Physiology*, 16(November 2013), 3419–3426;
- Ortega-Sáenz, P., Pardal, R., Levitsky, K., Villadiego, J., Muñoz-Manchado, A. B., Durán, R., ... López-Barneo, J. (2013). Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 24), 6157–73;
- Owens, B. (2014). Cell physiology: The changing colour of fat. *Nature*, 508(7496), S52–3;
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2008). Glucolipotoxicity: Fuel excess and β -cell dysfunction. *Endocrine Reviews*, 29(3), 351–366;

- Rio, R. D., Marcus, N. J. & Schultz, H. D. (2013). Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25);
- Ribeiro, M. J., Sacramento, J. F., Gonzalez, C., Guarino, M. P., Monteiro, E. C., & Conde, S. V. (2013). Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes*, 62(8), 2905–2916;
- Rios, M., Habecker, B., Sasaoka, T., Eisenhofer, G., Tian, H., Landis, S., ... Roffler-Tarlov, S. (1999). Catecholamine synthesis is mediated by tyrosinase in the absence of tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience*, 19(9), 3519–3526;
- Rodrigues, T., Matafome, P., Santos-Silva, D., Sena, C., & Seça, R. (2013). Reduction of methylglyoxal-induced glycation by pyridoxamine improves adipose tissue microvascular lesions. *Journal of Diabetes Research*, 2013;
- Rodrigues, T., Matafome, P., & Seça, R. (2013). A vascular piece in the puzzle of adipose tissue dysfunction: mechanisms and consequences. *Arch Physiol Biochem*, 120(1), 1–11;
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), 847–853;
- Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M., & Cacicedo, J. M. (2013). Science in medicine AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(7), 2764–2772;

- Rutkowski, J. M., Davis, K. E., & Scherer, P. E. (2009). Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS Journal*, 276(20), 5738–5746;
- Sacramento, J. F., Ribeiro, M. J., Rodrigues, T., Olea, E., Melo, B. F., Guarino, M. P., ... Conde, S. V. (2016). Functional abolition of carotid body activity restores insulin action and glucose homeostasis in rats: key roles for visceral adipose tissue and the liver. *Diabetologia*, 60(1), 158–168;
- Sarkar, C., Chakroborty, D., & Basu, S. (2013). Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: The role of catecholamines. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(1), 7–14;
- Scanzano, A., & Cosentino, M. (2015). Adrenergic regulation of innate immunity: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 6(Aug);
- Scherer, P. E. (2006). Adipose tissue: From lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*, 55(6), 1537–1545;
- Smith, C. J. & Ryckman, K. K. (2015). Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity , diabetes , and metabolic syndrome. *Dove Press Journal*, 295–302;
- Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., & Kasuga, M. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 51(7), 2045–2055;
- Tellechea, M. L., Mensegue, M. F., & Pirola, C. J. (2017). The Association between High Fat Diet around Gestation and Metabolic Syndrome-related Phenotypes in Rats : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nature*, (May), 1–18;

- Vargovic, P., Ukropec, J., Laukova, M., Cleary, S., Manz, B., Pacak, K., & Kvetnansky, R. (2011). Adipocytes as a new source of catecholamine production. *FEBS Letters*, 585(14), 2279–2284;
- Vieira-Coelho, M. A., Serrão, M. P., Afonso, J., Pinto, C. E., & Moura, E. (2009). Catecholamine synthesis and metabolism in the central nervous system of mice lacking $\alpha 2$ -adrenoceptor subtypes. *British Journal of Pharmacology*, 158(3), 726–737;
- Vona-Davis, L., & Rose, D. P. (2007). Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*, 14(2), 189–206;
- Wehrwein, E. A., Basu, R., Basu, A., Curry, T. B., Rizza, R. A., & Joyner, M. J. (2010). Hyperoxia blunts counterregulation during hypoglycaemia in humans: possible role for the carotid bodies? *The Journal of Physiology*, 588(Pt 22), 4593–601;
- Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2004). Five of stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*, 53(SUPPL.3);
- Wellen, K. E., & Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation , stress , and diabetes, 115(5), 1111–1119;
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M., & Pratley, R. E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(6), 787–794;
- Ye, J. (2009). Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *International Journal of Obesity*, 33(1), 54–66;

- Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*, 7(1), 14–24;
- Zang, L., Hao, H., Liu, J., Li, Y., Han, W., & Mu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 1–11;
- Zhang, M., Buttigieg, J., & Nurse, C. A. (2007). Neurotransmitter mechanisms mediating low-glucose signalling in cocultures and fresh tissue slices of rat carotid body. *The Journal of Physiology*, 578(3), 735–750.