

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Sara Ferreira Oliveira

**AVALIAÇÃO DE DERIVADOS DA CURCUMINA COM  
EFEITOS HIPOGLICEMIANTES**

**Dissertação no âmbito do Mestrado em Farmacologia Aplicada orientada  
pela Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos e pelo  
Professor Doutor Paulo Nuno Centeio Matafome e apresentada à Faculdade  
de Farmácia da Universidade de Coimbra.**

Julho de 2019



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**

## **Avaliação de derivados da curcumina com efeitos hipoglicemiantes**

**Sara Ferreira Oliveira**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia Aplicada, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos do grupo de Farmacologia e Cuidados Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e do *Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR)*, e sob a orientação do Professor Doutor Paulo Nuno Centeio Matafome do *Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR)*, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

## **Agradecimentos**

Chega ao fim o que foi a melhor etapa da minha vida até hoje. Uma etapa que me deu a oportunidade de começar um sonho, de incorporar uma área pela qual realmente tenho gosto, mas, mais que tudo isso, uma etapa que me permitiu conhecer pessoas admiráveis, com uma capacidade de trabalho estrondosa e com um espírito de entreatajuda e de apoio incansável, com as quais partilhei momentos que irei certamente recordar para sempre. Desta forma, deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.

À minha Orientadora Professora Doutora Sónia Santos, um enorme agradecimento pela confiança em me ter acolhido, pelos conhecimentos e ensinamentos científicos transmitidos, pela disponibilidade, pela preocupação, atenção e ajuda. O meu profundo agradecimento pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

Ao meu Orientador Professor Doutor Paulo Matafome, queria expressar toda a minha gratidão por tudo o que me proporcionaste. O meu mais sincero obrigado por todos os ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade, por toda a confiança depositada em mim e, principalmente, pela oportunidade neste projeto. Acima de tudo, muito obrigado pela tua amizade, por todos os momentos partilhados dentro e fora do laboratório, pela constante ajuda e apoio, e por sempre me transmitires um espírito de tranquilidade e positivismo quando mais era necessário. Um enorme obrigado por me teres recebido desta forma na Fisiologia, foi, sem dúvida, a melhor oportunidade que poderia ter tido. Espero que, de alguma forma, um dia consiga agradecer por tudo e, sem dúvida, por ter aprendido com o melhor.

À Professora Doutora Maria Paula Robalo e à Professora Fátima Piedade pela colaboração, pela atenção e pela disponibilidade para o esclarecimento de qualquer dúvida.

À Professora Doutora Rosa Fernandes, agradeço pela colaboração que proporcionou uma oportunidade para o enriquecimento do projeto e para aprendizagem pessoal, e pela constante demonstração de disponibilidade para o esclarecimento de qualquer dúvida.

Às minhas colegas e amigas do laboratório, Cátia Barra, Gabriela Tavares e Mariana Rocha por sempre se mostrarem disponíveis em ajudar-me, por todo o apoio e por todas os momentos partilhados dentro e fora do laboratório, um grande obrigado. Ao Luís Apeçada e à Rita Henriques, o meu agradecimento pela vossa disponibilidade e ajuda.

À Beatriz Martins, amiga e colega de laboratório, por estar sempre pronta a ajudar, por todos os conselhos ao longo desta etapa, pelas palavras de apoio e pelos momentos partilhados. Obrigado pela colaboração e pela disponibilidade.

À Tamaeh Monteiro, minha amiga e colega de laboratório, não existem palavras que cheguem para a gratidão que eu sinto por tudo o que já me ajudaste. A nível profissional, agradeço por todos os ensinamentos transmitidos e por toda a disponibilidade ao longo deste projeto. Mas, acima de tudo, muito obrigado pela tua amizade, pela preocupação, pelos conselhos, por todas as conversas que, em momentos menos bons, me tranquilizavam e me faziam acreditar em mim e, principalmente, por sempre fazeres de tudo o que estava ao teu alcance para me ajudar. Um enorme obrigado por todos os momentos partilhados dentro e fora do laboratório, todas as estravagâncias de horários e por todo o apoio incondicional. Obrigado por tudo.

À Catarina Carvalho, minha amiga de longa data, que desde que conheci sempre foi a pessoa que mais acreditou em mim e que sempre me motivou em tudo. Obrigado por todo o apoio, por seres a pessoa que, independentemente de tudo, sempre esteve a meu lado. Obrigado por todos os conselhos ao longo deste ano, e principalmente, obrigado pela tua amizade, o teu apoio foi fundamental nesta etapa.

O meu maior agradecimentos aos meus pais, Anabela Oliveira e José Carlos Oliveira, e aos meus avós, Alzira Rodrigues e Manuel Ferreira, por tudo o que fizeram e fazem por mim. Obrigado por todas as palavras, e por serem as pessoas que sempre estiveram e estão ao meu lado, independentemente de tudo.

Por fim, ao meu afilhado que, mesmo com apenas meses de idade foi, diariamente, parte da razão do meu sorriso ao longo desta etapa.

# Índice

Lista de Abreviaturas .....	i
Lista de Figuras .....	v
Lista de Tabelas .....	vii
Resumo .....	viii
Abstract .....	x
<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	<b>1</b>
1. Diabetes Mellitus tipo 2 .....	2
1.1. Epidemiologia .....	2
1.2. Caracterização fisiopatológica.....	3
1.2.1. Resistência à insulina .....	3
1.2.2. Disfunção das células $\beta$ -pancreáticas.....	5
1.2.3. Glicotoxicidade .....	6
1.3. Complicações da DM tipo 2.....	10
1.3.1. Disfunção endotelial.....	10
2. Curcumina.....	13
2.1. Origem e descoberta da curcumina .....	13
2.2. Propriedades químicas e biológicas.....	14
2.3. Biodisponibilidade e segurança.....	16
2.4. Atividades biológicas .....	17
2.4.1. Propriedades antioxidantes .....	17
2.4.2. Propriedades anti-inflamatórias .....	19
2.4.3. Propriedades antidiabéticas .....	20
2.5. Derivados da Curcumina.....	21
<b>Capítulo II – Enquadramento do Estudo</b> .....	<b>24</b>
<b>Capítulo III – Objetivos</b> .....	<b>27</b>
<b>Capítulo IV – Materiais e Métodos</b> .....	<b>29</b>
1. Estudos <i>in vivo</i> - Modelo animal.....	30
2. Análise sistémica <i>in vivo</i> .....	31
2.1. Monitorização do peso .....	31
2.2. Níveis plasmáticos de glicose .....	31
2.3. Prova de tolerância à insulina .....	32
2.4. Níveis plasmáticos dos ácidos gordos livres .....	32
2.5. Colheita de sangue e recolha de tecidos .....	32

3. Estudos <i>in vitro</i> – Estudos Funcionais .....	33
3.1. Isolamento e preparação da aorta .....	33
3.2. Reagentes e compostos utilizados .....	33
3.3. Procedimento experimental .....	33
4. Imunohistoquímica .....	35
5. Análises bioquímicas – Western Blotting.....	36
5.1. Reagentes utilizados .....	36
5.2. Preparação das amostras.....	37
5.3. Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida.....	37
5.4. Transferência do Gel para a Membrana de PVDF.....	37
5.5. Incubação e marcação com Anticorpos.....	38
5.6. Revelação das membranas .....	38
6. Análise estatística .....	40
6.1. Análise estatística dos resultados do estudo <i>in vivo</i> e da análise bioquímica.....	40
6.2. Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais .....	40
<b>Capítulo V – Resultados.....</b>	<b>41</b>
1. Monitorização da ingestão calórica e do peso.....	42
2. Glicemia e Sensibilidade à Insulina.....	44
2.1. Níveis plasmáticos de glicose e teste de tolerância à insulina .....	44
2.2. Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres .....	45
2.3. Análise dos marcadores envolvidos no metabolismo da glicose no tecido adiposo epididimal.....	46
3. Avaliação da função vascular.....	47
3.1. Resposta vasorrelaxante da aorta isolada .....	47
3.2. Efeito do ácido ascórbico na resposta vasorrelaxante da aorta isolada.....	49
3.3. Análise dos marcadores da função endotelial por Western Blotting .....	50
3.4. Imunohistoquímica.....	52
3.4.1. Nitrotirosina .....	52
<b>Capítulo VI – Discussão .....</b>	<b>54</b>
<b>Capítulo VII – Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo VIII – Referências.....</b>	<b>63</b>

## Lista de Abreviaturas

<b>ACC</b>	Carboxilase da Acetil-coA ( <i>Acetyl-coA carboxylase</i> )
<b>ACh</b>	Acetilcolina ( <i>acetylcholine</i> )
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato ( <i>adenosine diphosphate</i> )
<b>AGEs</b>	Produtos finais de glicação avançada ( <i>advanced glycation end products</i> )
<b>AMPK</b>	Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato ( <i>adenosine monophosphate-activated protein kinase</i> )
<b>ARE</b>	Elemento de resposta antioxidante ( <i>antioxidant response element</i> )
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato ( <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>AUC</b>	Área sob a curva ( <i>area under a curve</i> )
<b>BSA</b>	Albumina bovina sérica ( <i>bovine serum albumin</i> )
<b>cGMP</b>	Monofosfato cíclico de guanosina ( <i>cyclic guanosine monophosphate</i> )
<b>COX</b>	Ciclooxigenase ( <i>cyclooxygenase</i> )
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2 ( <i>cyclooxygenase-2</i> )
<b>CPT-I</b>	Carnitina-Palmitoil transferase I ( <i>carnitine palmitoyltransferase I</i> )
<b>CR</b>	Concentração-resposta ( <i>concentration-response</i> )
<b>DAG</b>	Diacilglicerol ( <i>diacylglycerol</i> )
<b>DAPI</b>	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole ( <i>4',6-diamidino-2-phenylindolehydrochloride</i> )
<b>DHAP</b>	Dihidroxiacetona fosfato ( <i>dihydroxyacetone phosphate</i> )
<b>DHE</b>	Dihidroetídio ( <i>dihydroethidium</i> )
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido ( <i>dimethyl sulfoxide</i> )
<b>Em<sub>ax</sub></b>	Resposta máxima
<b>eNOS</b>	Sintetase do óxido nítrico endotelial ( <i>oxide nitric synthetase</i> )
<b>ERK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular ( <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
<b>ET-I</b>	Endotelina-I ( <i>endothelin-I</i> )
<b>F-6-P</b>	Frutose-6-fosfato ( <i>fructose 6-phosphate</i> )
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Dinucleótido de flavina e adenina reduzido ( <i>reduced flavin adenine dinucleotide</i> )

<b>FFA</b>	Ácidos gordos livres ( <i>free fatty acids</i> )
<b>G-3-P</b>	D-gliceraldeído-3-fosfato ( <i>D-glyceraldehyde 3-phosphate</i> )
<b>GFAT</b>	Glutamina:fructose-6-fosfato aminotransferase ( <i>glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase</i> )
<b>GK</b>	Goto-Kakizaki
<b>GLO1</b>	Glioxalase I ( <i>glyoxalase I</i> )
<b>GLO2</b>	Glioxalase I ( <i>glyoxalase 2</i> )
<b>GLUT</b>	Transportador de glicose ( <i>glucose transporter</i> )
<b>GLUT4</b>	Transportador de glicose 4 ( <i>glucose transporter 4</i> )
<b>GSH</b>	Glutationa ( <i>glutathione</i> )
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator induzível por hipoxia I ( <i>hypoxia-inducible factor-1</i> )
<b>HO-1</b>	Heme oxigenase I
<b>HUVEC</b>	Células endoteliais da veia umbilical humana ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
<b>IAPP</b>	Polipeptídeo amiloide dos ilhéus ( <i>islet amyloid polypeptide</i> )
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>
<b>IKK</b>	I $\kappa$ b cinase ( <i>I<math>\kappa</math>b kinase</i> )
<b>IKK<math>\beta</math></b>	I $\kappa$ b cinase $\beta$ ( <i>I<math>\kappa</math>b kinase <math>\beta</math></i> )
<b>IL-6</b>	Interleucina 6 ( <i>interleukin 6</i> )
<b>IR</b>	Recetor de insulina ( <i>insulin receptor</i> )
<b>IRS</b>	Substrato do recetor de insulina ( <i>insulin receptor substrate</i> )
<b>JNK</b>	Cinase N-terminal do c-jun ( <i>c-Jun N-terminal kinases</i> )
<b>Keap1</b>	Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch ( <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i> )
<b>L-NAME</b>	Éter metílico de NG-Nitro-L-arginina ( <i>NG-Nitro-L-arginine methylesther</i> )
<b>LOX</b>	Lipoxigenase ( <i>lipoxigenase</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo ( <i>lipopolysaccharide</i> )
<b>MGO</b>	Metilglioxal ( <i>methylglyoxal</i> )
<b>MG-HI</b>	Hidroimidazolona derivada de metilglioxal ( <i>methylglyoxal-derived hydroimidazolone</i> )
<b>NA</b>	Noradrenalina ( <i>noradrenaline</i> )

<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido ( <i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i> )
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear kappa B ( <i>nuclear factor-kappa B</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico ( <i>nitric oxide</i> )
<b>Nrf2</b>	Fator 2 relacionado com o fator nuclear eritroide ( <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i> )
<b>OGT</b>	UDP-NAc transferase ( <i>O-linked N-acetylglucosamine transferase</i> )
<b>PA-I</b>	Ativador do plasminogénio tipo I ( <i>plasminogen activator inhibitor-I</i> )
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Coativador-1 alfa do recetor ativado por proliferadores de peroxissoma gama ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-cinase ( <i>phosphatidylinositol-3-kinase</i> )
<b>PKB</b>	Proteína cinase B ( <i>protein kinase B</i> )
<b>PKC</b>	Proteína cinase C ( <i>protein kinase C</i> )
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	Recetor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> )
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Recetor ativado por proliferadores de peroxissoma gama ( <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> )
<b>ProIAPP</b>	Polipeptídeo da pró-amilina ( <i>pro-islet amyloid polypeptide</i> )
<b>RAGE</b>	Recetor dos produtos de glicação avançada ( <i>receptor for advanced glycation end products</i> )
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigénio ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SD</b>	Sprague-Dawley
<b>S.E.M.</b>	Erro padrão da média ( <i>standard error of the mean</i> )
<b>Sirt1</b>	Sirtuína 1 ( <i>sirtuin 1</i> )
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase ( <i>superoxide dismutase 1</i> )
<b>STZ</b>	Estreptozotocina ( <i>streptozotocin</i> )
<b>T2DM</b>	Diabetes Mellitus tipo 2 ( <i>type 2 Diabetes Mellitus</i> )
<b>TAE</b>	Tecido adiposo epididimal
<b>TBS</b>	Solução tampão de tris ( <i>tris buffer solution</i> )
<b>TCA</b>	Ciclo do ácido tricarbóxico ( <i>tricarboxylic acid cycle</i> )

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TNF</b>	Fatores de necrose tumoral ( <i>tumor necrosis factor</i> )
<b>TTI</b>	Teste de tolerância à insulina
<b>UDP-GlcNAc</b>	Uridina difosfato N-acetilglucosamina ( <i>uridine diphosphate N-acetylglucosamine</i> )
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>W</b>	Wistar

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Mecanismos subjacentes à toxicidade induzida pela hiperglicemia: ativação da via do poliol; aumento do fluxo da hexosamina; ativação da PKC; formação de AGEs.	Página 7
<b>Figura 2</b>	Estrutura química da Curcumina e respetivos grupos reativos.	Página 15
<b>Figura 3</b>	Protocolo experimental do estudo <i>in vivo</i> .	Página 31
<b>Figura 4</b>	Avaliação da ingestão calórica (A) e do consumo de água (B) dos diferentes grupos experimentais.	Página 42
<b>Figura 5</b>	Evolução do peso corporal ao longo dos 15 dias do estudo (A) e percentagem de ganho de peso (B) dos diferentes grupos experimentais.	Página 43
<b>Figura 6</b>	Avaliação do peso do TAE (A), do rim (B) e do fígado (C) expressos em percentagem do peso corporal.	Página 43
<b>Figura 7</b>	Avaliação da glicemia ao longo do estudo, com medições nos dias 0, 7 e 14.	Página 44
<b>Figura 8</b>	Avaliação da AUC calculada a partir do TTI realizado nos dias 0 e 14.	Página 45
<b>Figura 9</b>	Avaliação dos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres.	Página 45
<b>Figura 10</b>	Avaliação dos níveis de GLUT4 no tecido adiposo epididimal.	Página 46
<b>Figura 11</b>	Relaxamento induzido pela ACh na ausência (Controlo) e na presença de L-NAME em anéis de aorta isolada dos animais do grupo Veículo.	Página 47

<b>Figura 12</b>	Relaxamento induzido pela ACh (em % de inibição da contração induzida pela NA) em anéis de aorta isolada dos animais dos diferentes grupos experimentais.	Página 48
<b>Figura 13</b>	Relaxamento induzido pela ACh na ausência (Controlo) e na presença de ácido ascórbico em anéis de aorta isolada dos animais dos grupos W (A), GK (B); Veículo (C); Curcumina (D); Derivado 27 (E); Derivado 20 (F).	Página 49
<b>Figura 14</b>	Avaliação dos níveis da Sirt1, da forma fosforilada do Nrf2, da Catalase, e das formas total e fosforilada da eNOS na aorta por Western Blotting.	Página 50
<b>Figura 15</b>	Avaliação dos níveis de GLO1 (A) e SOD1 (B) no tecido adiposo epididimal por Western Blotting, bem como imagens representativas de outros marcadores de stress oxidativo, glicação e função vascular do tecido adiposo.	Página 51
<b>Figura 16</b>	Determinação dos níveis de GLO1, p-Nrf2, Nrf2 e SOD1 no rim (A) e no fígado (B) por Western Blotting.	Página 52
<b>Figura 17</b>	Marcação da nitrotirosina em cortes histológicos da aorta dos animais dos diferentes grupos em estudo.	Página 53

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Derivados da curcumina sintetizados pela Professora Doutora Maria Paula Robalo e pela Professora Doutora Fátima Piedade, do CQE, Complexo I, Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.	Página 25
<b>Tabela 2</b>	Anticorpos primários utilizados em Western Blotting.	Página 36
<b>Tabela 3</b>	Constituição das soluções utilizadas em Western Blotting.	Página 39
<b>Tabela 4</b>	Valores de $E_{máx}$ e $pEC_{50}$ para a ACh em aorta isolada dos diferentes grupos experimentais.	Página 48

## Resumo

As propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes da curcumina podem ser determinantes no tratamento de doenças metabólicas, como a diabetes. Apesar da sua forte atividade intrínseca, a sua baixa biodisponibilidade limitou o seu uso clínico, devido à combinação de um eficiente metabolismo de primeira passagem, má absorção gastrointestinal, rápida eliminação e baixa solubilidade aquosa. Para superar estas limitações, foram sintetizados dois derivados da curcumina.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos dois derivados da curcumina na homeostase da glicose e na função endotelial num modelo animal de diabetes tipo 2 não obeso, o rato Goto-Kakizaki (GK). Para esse efeito, foram utilizados ratos GK com 14 semanas de idade, das nossas colónias de reprodução (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra), durante 2 semanas. Os animais GK foram divididos em cinco grupos: controlos (GK); GK submetidos a administração de veículo por via subcutânea (Veículo, DMSO, 100  $\mu$ L/dia); GK submetidos a tratamento com a mesma quantidade equimolar (35  $\mu$ mol/dia) de curcumina (Curcumina, 40mg/kg/dia), de Derivado 20 (Derivado 20, 40 mg/kg/dia); ou de Derivado 27 (Derivado 27, 52,4 mg/kg/dia). Um grupo de 5 ratos Wistar (W) foi utilizado como controlo. Foram avaliados durante o tratamento parâmetros bioquímicos, glicemia em jejum, tolerância à insulina, peso corporal, ingestão calórica e consumo de água.

Após o tratamento, os ratos foram anestesiados (via injeção intraperitoneal com uma solução 2:1 (v/v) de 50 mg/kg de cetamina (100 mg/mL) e 2,5% de clorpromazina (5 mg/mL)), foram colhidas amostras de sangue e, de seguida, os ratos foram sacrificados para colheita de tecido adiposo epididimal, rim, fígado e aorta. Foram preparados anéis da aorta para a realização de curvas cumulativas concentração-resposta de relaxamento isométrico à acetilcolina (ACh, 0,01 a 90  $\mu$ M), após pré-contracção com 10  $\mu$ M de noradrenalina (NA) na ausência e na presença de 100  $\mu$ M de ácido ascórbico.

No que diz respeito aos efeitos metabólicos, o Derivado 27 teve um efeito muito acentuado na redução da glicemia. Nos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres (*free fatty acids*, FFA) verificou-se igualmente uma redução com o Derivado 27, o que foi também observado com o Derivado 20, embora com um menor efeito. Nos animais tratados com curcumina e Derivado 27, observou-se um aumento significativo dos níveis do transportador de glicose 4 (GLUT4) no tecido adiposo. Na aorta, o tratamento com curcumina e com o

Derivado 27 aumentou o relaxamento NO-dependente induzido pela ACh. Após incubação com ácido ascórbico, a resposta da curcumina foi semelhante ao grupo Veículo, no entanto o tratamento com o Derivado 20 e 27 aumentou significativamente o relaxamento na presença de ácido ascórbico, sendo mais acentuado com o Derivado 27, restaurando a resposta observada no grupo Wistar, o que sugere que o mecanismo responsável pelos efeitos observados pode estar relacionado com o estado oxidativo. Uma vez que não se verificaram alterações significativas nas vias de sinalização envolvidas no vasorrelaxamento, nomeadamente nas formas total e fosforilada na eNOS, e nas vias de detoxificação das aortas isoladas dos diferentes grupo experimentais, foi avaliado o stress nitrosativo. Considerando que foi apenas analisada uma amostra de cada grupo, os resultados preliminares parecem sugerir uma diminuição da imunomarcagem para a nitrotirosina nos animais tratados com Derivado 27. Em concordância, no tecido adiposo epididimal, intimamente relacionado com a função vascular, foi observada uma normalização dos níveis de GLOI e um aumento os níveis de SODI, sendo que ambas as enzimas contribuem para diminuição do stress oxidativo.

Em conclusão, o tratamento com o Derivado 27 melhorou o perfil glicémico e lipídico e a capacidade antioxidante, com conseqüente diminuição do stress oxidativo, o que se traduziu na melhoria da função endotelial.

**Palavras-chave:** Diabetes Mellitus tipo 2; Complicações Cardiovasculares; Disfunção Endotelial; Stress Oxidativo; Açafirão-da-terra.

## Abstract

The anti-inflammatory and antioxidant properties of curcumin may be determinant in the treatment of metabolic diseases such as diabetes. Despite its strong intrinsic activity, its low bioavailability, due to a combination of efficient first pass metabolism, gastrointestinal malabsorption, rapid elimination and low aqueous solubility have limited its clinical use. In order to overcome such limitations, two curcumin derivatives have been synthesized.

So, the aim of this study was to evaluate the effects of the two derivatives of curcumin on glucose homeostasis and endothelial function in a non-obese animal model of type 2 diabetes, Goto-Kakizaki (GK) rat. For that purpose, 14 weeks GK rats, from our breeding colonies (Faculty of Medicine, University of Coimbra), were used for 2 weeks. GK animals were divided into five groups: controls (GK); GK submitted to subcutaneous administration of vehicle (*Veículo*, DMSO, 100  $\mu$ L/day); GK submitted to treatment with the same equimolar quantity (35  $\mu$ mol/day) of curcumin (*Curcumina*, 40 mg/kg/day), Derivative 20 (*Derivado 20*, 40 mg/kg/day), or Derivative 27 (*Derivado 27*, 52 mg/kg/day). A group of 5 Wistar rats (W) was use as control. During treatment biochemical parameters, fasting glycemia, insulin tolerance, body weight, caloric intake and water consumption were evaluated.

After treatment, rats were anaesthetized (via intraperitoneal injection of a 2:1 (v/v) 50mg/kg ketamine (100 mg/mL) and 2.5% chlorpromazine (5 mg/mL)), blood samples were collected, and then rats were sacrificed to collect epididimal adipose tissue, kidney, liver and aorta. Aorta rings were prepared for cumulative concentration-response (CR) isometric relaxation curves to acetylcholine (ACh, 0.01 to 90  $\mu$ M) after precontraction with 10  $\mu$ M of noradrenaline (NA) in the absence and presence of 100  $\mu$ M ascorbic acid.

Regarding metabolic effects, Derivative 27 had a markedly effect in glycemia lowering. In the levels of plasma free fatty acids (FFA), were also verified a reduction with Derivative 27, also observed with Derivative 20, although with a smaller effect. In animals treated with curcumin and Derivative 27, a significant increase in glucose transporter 4 (GLUT4) levels were observed in adipose tissue. In aorta, the treatment with curcumin and Derivative 27 increased the NO-dependent relaxation induced by the ACh. After incubation with ascorbic acid, the curcumin response was similar to *Veículo* group, however the treatment with Derivatives 20 and 27 significantly increased the relaxation in the presence of ascorbic acid, being more pronounced in the Derivative 27 group, restoring the response observed in Wistar group, which suggest that the mechanism under the observed effects can be related to the

oxidative state. Since there were no significant differences in the vasorelaxation signalling pathways, namely in total and phosphorylated eNOS forms, and in the detoxification pathways of the isolated aortas from the different experimental groups, the nitrosative stress was evaluated. Considering that was only analysed one sample of each group, the preliminary results seems to suggest a decrease in the nitrotyrosine immunostaining in animals treated with Derivative 27. In concordance, in epididimal adipose tissue, that is extensively related with vascular function, a normalization of glyoxalase I (GLOI) levels and an increase of superoxide dismutase (SODI) levels were observed, both enzymes contributing to the reduction of oxidative stress.

Taken together, treatment with Derivative 27 improved glycaemic and lipolytic profiles, with consequent reduction of oxidative stress, improving endothelial function.

**Keywords:** Type 2 Diabetes Mellitus; Cardiovascular Complications; Endothelial Dysfunction; Oxidative Stress; Turmeric.

# **Capítulo I**

## **Introdução**

## **I. Diabetes Mellitus tipo 2**

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crónica caracterizada por um aumento dos níveis de glicose no sangue, denominado hiperglicemia. Surge na sequência de um défice de secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas e/ou da resistência à ação da insulina por parte dos tecidos. A longo prazo, a hiperglicemia crónica leva ao desenvolvimento de condições patológicas, às quais se dá o nome de complicações da DM, tais como doença cardiovascular, nefropatia, retinopatia, neuropatia, disfunção endotelial, dislipidemia, aterosclerose, hipertensão, obesidade, entre outras. Em consequência dessas complicações, a DM está associada a morbilidade significativa e reduzida qualidade e esperança de vida (*American Diabetes Association, 2010*).

### **I.1. Epidemiologia**

Atualmente, a Diabetes é um dos maiores problemas de saúde pública nos países desenvolvidos, sendo considerada pelo *Global Burden of Disease Study* de 2013, uma das 10 maiores causas de morte, equivalente a uma morte a cada seis segundos (*Collaborators, 2015; International Diabetes Federation, 2017; Zheng, Ley e Hu, 2017*). Segundo a estimativa da *International Diabetes Federation* (IDF), a doença abrange 8,8% da população mundial (425 milhões de adultos) com idades compreendidas entre 20 e 79 anos, ou seja, 1 em cada 11 indivíduos tem diabetes. Estima-se que este número aumente 48% (629 milhões de adultos) em 2045 (*International Diabetes Federation, 2017*).

Na população portuguesa, dentro da mesma faixa etária, a prevalência de DM estimada em 2015 foi de 13,3% da população, com um aumento de 1,6% em relação à estimativa realizada em 2009. Este aumento está associado ao impacto do envelhecimento da estrutura etária portuguesa (*Sociedade Portuguesa de Diabetologia, 2016*).

Aproximadamente 90% dos casos de Diabetes Mellitus são do tipo 2 (*Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM*), o que, muito provavelmente, está associado à suscetibilidade genética, mas sobretudo ao estilo de vida sedentário, obesidade, dietas de alto aporte calórico e idade da população atual. A maioria dos doentes com T2DM desenvolve complicações associadas à doença, das quais as complicações cardiovasculares são as que causam mais morbilidade e mortalidade (*Zheng, Ley e Hu, 2017*).

## 1.2. Caracterização fisiopatológica

A T2DM é um distúrbio metabólico heterogêneo caracterizado por hiperglicemia, que numa das suas vertentes, se associa à falha na resposta à insulina pelas células dos tecidos insulino-dependentes (músculo e tecido adiposo), a denominada resistência à insulina (Virally *et al.*, 2007).

Para compensar esta condição e manter a homeostase da glicose, as células  $\beta$ -pancreáticas dos Ilhéus de Langerhans aumentam a taxa de secreção de insulina. Este processo compensatório está associado a uma condição denominada pré-diabetes, no qual o organismo é, ainda, capaz de compensar a resistência à insulina existente (Kahn *et al.*, 2014; Virally *et al.*, 2007).

Contudo, ao longo do tempo, este aumento da secreção de insulina, sem a adoção de hábitos menos sedentários ou de uma dieta menos calórica, exige uma sobrecarga das células  $\beta$ , o que pode culminar na sua exaustão e apoptose, com diminuição gradual da produção de insulina e consequente resposta compensatória inadequada e insuficiente. Esta diminuição estimula ainda a produção hepática de glicose, instalando-se um quadro de hiperglicemia crónica (Virally *et al.*, 2007).

### 1.2.1. Resistência à insulina

O mecanismo de resistência à insulina está associado à sua via de sinalização na célula. A entrada de glicose nas células ocorre através dos transportadores de glicose (*Glucose transporter*, GLUT). No tecido adiposo e no músculo, este transporte está dependente da sinalização da insulina, pelo que estes tecidos são intitulados insulino-dependentes. O recetor de insulina (*insulin receptor*, IR) encontra-se na membrana da célula, contendo duas subunidades  $\alpha$  extracelulares e duas subunidades  $\beta$  intracelulares com atividade tirosina cinase. A insulina liga-se à subunidade  $\alpha$ , ativando a tirosina cinase, que fosforila os resíduos de tirosina da subunidade  $\beta$ , o que resulta na ativação do substrato do recetor de insulina (*Insulin Receptor Substrate*, IRS). Este evento permite a ligação de várias proteínas de sinalização, nas quais se inclui a fosfatidilinositol-3-cinase (*phosphatidylinositol-3-kinase*, PI3K). Esta cinase por sua vez ativa uma serina/treonina cinase, denominada Akt ou proteína cinase B (*Protein Kinase B*, PKB), que promove a translocação do GLUT4 para a membrana da célula, permitindo a entrada da glicose (Stumvoll, Goldstein e Haeften, van, 2007; Taha e Klip, 1999).

Contudo, existem proteínas com a capacidade de fosforilar os resíduos de serina ou treonina do IRS, o que diminui a capacidade de atuar como substrato para a atividade tirosina cinase do IR. Como tal, a sinalização da insulina é interrompida, o que causa resistência à insulina (Stumvoll, Goldstein e Haeften, van, 2007).

A insulina tem um perfil de liberação bifásico, que, perante um estímulo de glicose, tem uma primeira fase aguda de liberação rápida de insulina pré-formada com duração de 10 minutos, ao qual se segue uma segunda resposta de maior duração, de liberação sustentada de insulina recém sintetizada, que finda quando a glicemia retorna aos seus valores basais. Numa situação de T2DM, a primeira fase de resposta é muito reduzida ou até mesmo inexistente. Ora, uma vez que essa fase é responsável por preparar os tecidos insulino-dependentes, a sua diminuição ou a sua ausência tem repercussões na ação da insulina (DeFronzo, 2004; Ostenson, 2001).

De entre os tecidos insulino-dependentes, o tecido adiposo é o que tem uma menor entrada de glicose nas células, porém é um tecido muito relevante para o desenvolvimento da insulino-resistência. Os adipócitos acumulam e libertam ácidos gordos livres (*Free Fatty Acids*, FFA) para a corrente sanguínea quando necessário, contudo quando os FFA se encontram em excesso, os adipócitos também libertam citocinas pró-inflamatórias, que têm consequências negativas a nível da sinalização da insulina. Paralelamente, os ácidos gordos, através do aumento dos níveis do diacilglicerol (*diacylglycerol*, DAG) celular, ativam cinases celulares, particularmente isoformas atípicas da proteína cinase C (*Protein Kinase C*, PKC), com consequente aumento da fosforilação das serinas do substrato do IRS e inibição da cascata de sinalização intracelular da insulina. Este processo é comumente denominado de “lipotoxicidade” (DeFronzo, 2010; Matafome e Seiça, 2017; Stumvoll, Goldstein e Haeften, van, 2007). A inflamação é um processo que também contribui para a resistência à insulina. A infiltração de macrófagos no tecido adiposo, provoca alterações no metabolismo lipídico, com aumento da lipólise, o que estimula a atividade do complexo I $\kappa$ B cinase (*I $\kappa$ B kinase*, IKK) e da proteína cinase N-terminal do c-jun (*c-Jun N-terminal kinases*, JNK), resultando na fosforilação das serinas do IRS, com consequente bloqueio da sinalização da insulina. No fígado, o aumento da interleucina 6 (*Interleukin 6*, IL-6), uma citocina pró-inflamatória, estimula a gliconeogénese hepática e aumenta a resistência à insulina (DeFronzo et al., 2015).

Nos doentes obesos, os adipócitos têm maior dimensão, estando a hipertrofia relacionada com a insulino-resistência, lipólise e níveis sanguíneos de ácidos gordos livres mais elevados (Stumvoll, Goldstein e Haeften, van, 2007).

Paralelamente, o tecido adiposo é igualmente relevante devido à formação e libertação de adiponectina para a corrente sanguínea. A adiponectina tem um papel essencial em manter a sensibilidade à insulina. O aumento dos níveis plasmáticos desta proteína vai predispor a sua ligação ao seu recetor 1 e 2 nos tecidos, estimulando a proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate-activated protein kinase*, AMPK), que fosforila e inibe, por sua vez, a Carboxilase da Acetil-CoA (*Acetyl-CoA Carboxylase*, ACC). A ACC catalisa a transferência de um grupo carboxílico para a Acetil-CoA dando origem à Malonil-CoA, substrato precursor da síntese de ácidos gordos. Assim a ACC inibida diminui a concentração de Malonil-CoA, o que resulta num aumento da Carnitina-Palmitoil transferase I (*Carnitine palmitoyltransferase 1*, CPT-1), com consequente aumento da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos livres, o que se traduz numa melhoria do perfil lipídico e da sensibilidade à insulina. O aumento da atividade da AMPK estimula o recetor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*, PPAR $\alpha$ ), que resulta no aumento da síntese das enzimas da oxidação dos ácidos gordos. No entanto, na condição de pré-diabetes e na T2DM existe uma diminuição da secreção de adiponectina e da expressão dos seus recetores, o que, por conseguinte, vai atenuar os efeitos benéficos da adiponectina (DeFronzo, 2010; Xu *et al.*, 2003).

Por outro lado, o recetor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR $\gamma$ ) é um fator de transcrição essencial para a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, e contribui para o aumento da translocação do GLUT4 e para o armazenamento de lípidos. Este fator atua quando interage com seu coativador, o coativador-1  $\alpha$  do recetor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1  $\alpha$* , PGC-1 $\alpha$ ), estimulando a expressão génica de enzimas envolvidas nos processos de adipogénese e de oxidação de ácidos gordos (Bays, Mandarino e DeFronzo, 2004; DeFronzo, 2010). Contudo, na T2DM, observa-se uma diminuição da expressão do PGC-1 $\alpha$  (Patti *et al.*, 2003).

### **1.2.2. Disfunção das células $\beta$ -pancreáticas**

A desregulação da secreção da insulina está associada à acumulação de amiloide nas células  $\beta$ , ao efeito nefasto da glicose na capacidade secretora de insulina e às alterações no perfil lipídico que podem ter efeitos a nível dos Ilhéus (Kahn, 2000). Uma vez que o pâncreas é um órgão que está num equilíbrio dinâmico entre a neogénese e a apoptose dos Ilhéus de Langerhans, as referidas alterações podem criar um distúrbio neste equilíbrio, com

consequente alteração da secreção de insulina, o que tem implicações nos seus níveis plasmáticos (DeFronzo, 2004).

Os depósitos da amiloide nos Ilhéus pancreáticos são agregados tóxicos de amilina (ou polipeptídeo amiloide dos Ilhéus, *Islet Amyloid Polypeptide*, IAPP), co-secretada com a insulina. A amilina resulta da clivagem do polipeptídeo de pró-amilina (*pro-islet amyloid polypeptide*, ProlAPP). O prolAPP forma os primeiros grânulos que permitem que o IAPP se agregue e forme os depósitos de amiloide, o que pode levar à apoptose de células  $\beta$ . A resistência à insulina na T2DM provoca uma demanda maior de produção de insulina que resulta na secreção de pró-insulina. O ProlAPP é secretado simultaneamente, no entanto, as enzimas que convertem ambas as moléculas precursoras em insulina e IAPP, não são capazes de acompanhar os altos níveis de secreção, levando à acumulação de ProlAPP. Os agregados formados por este polipeptídeo nos Ilhéus foram alvo de estudos *postmortem*, nos quais se observou um aumento em doentes com T2DM. Ora, uma vez que mais de 90% dos doentes têm redução das células  $\beta$  funcionais, tal sugere que os depósitos da amiloide induzem uma cascata de apoptose levando à perda de células  $\beta$  funcionais e comprometendo-se a secreção de insulina (Gerich, 1996; Kahn, 2000; Ludvik *et al.*, 1991; Stumvoll, Goldstein e Haeften, van, 2007).

### **1.2.3. Glicotoxicidade**

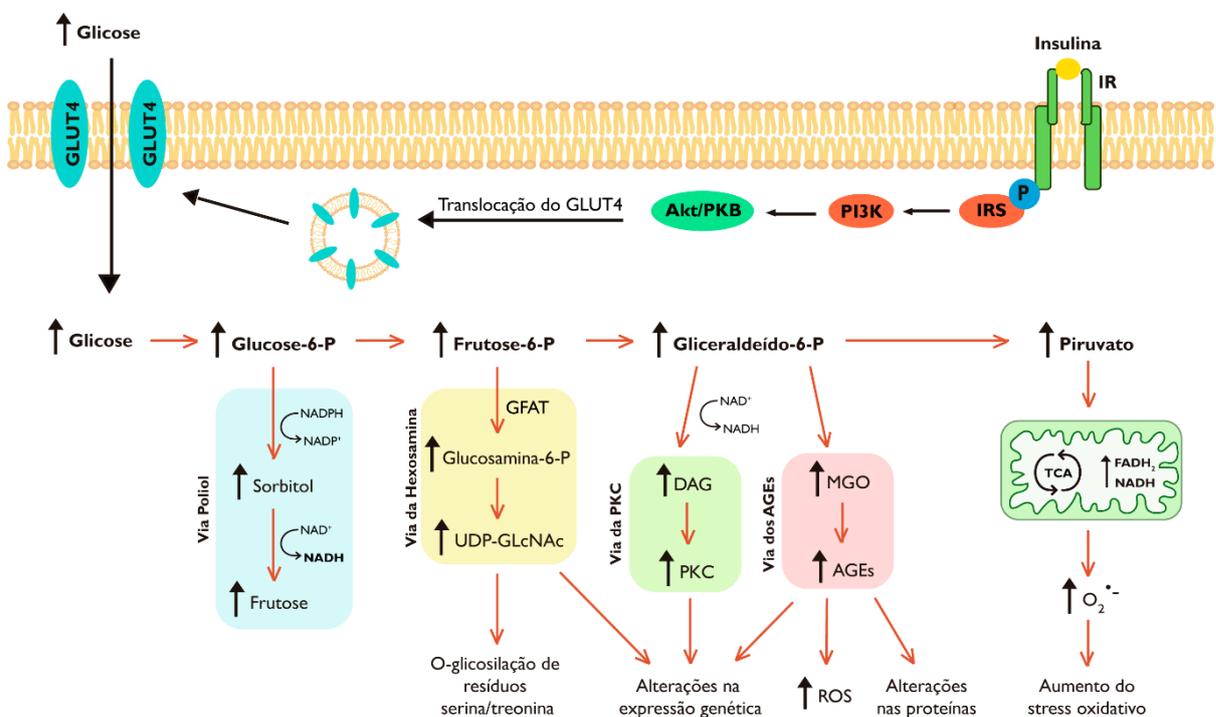
A homeostase da glicose é mantida pelo equilíbrio entre vários processos no organismo, tais como: secreção de insulina e de fatores de crescimento semelhantes à insulina; absorção e utilização da glicose pelos tecidos; produção de glicose hepática, etc. De entre estes processos, a atividade da insulina nos tecidos é o principal mecanismo de controlo da homeostase (Kawahito, Kitahata e Oshita, 2009).

Na hiperglicemia, a glicose induz um efeito tóxico, com produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species*, ROS) e consequente aumento do stress oxidativo. A glicólise gera piruvato, que é transportado para a mitocôndria, onde sofre oxidação pelo ciclo do ácido tricarboxílico (*tricarboxylic acid cycle*, TCA), resultando a formação do dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (*reduced nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH) e do dinucleótido de flavina e adenina reduzido (*reduced flavin adenine dinucleotide*, FADH<sub>2</sub>). Estas moléculas atuam como dadores de eletrões para a cadeia respiratória da mitocôndria, na qual o fluxo de eletrões gera um gradiente de protões, com consequente

diferença de potencial eletroquímico na membrana mitocondrial, a qual é utilizada para gerar o trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*, ATP) (Rolo e Palmeira, 2006).

Perante um aumento da glicemia, a formação dos doadores de elétrons NADH e FADH<sub>2</sub> está aumentada, e, como tal, o gradiente protônico aumenta, com conseqüente elevação da diferença de potencial eletroquímico. Tal culmina no aumento da formação de ATP e na hiperpolarização do potencial da membrana mitocondrial. Por conseguinte, a elevação do potencial pode levar à acumulação de elétrons, o que vai levar à redução parcial do oxigênio, com aumento da formação do superóxido (Brownlee, 2001; Rolo e Palmeira, 2006).

Ora, este processo é considerado o fator que impulsiona os seguintes mecanismos (figura 1): aumento da produção de produtos finais da glicação avançada (*advanced glycation end products*, AGEs); aumento do fluxo da via da hexosamina; ativação da PKC; ativação da via da aldose redutase (via do polioli) (He e King, 2004; Kawahito, Kitahata e Oshita, 2009).



**Figura 1 – Mecanismos subjacentes à toxicidade induzida pela hiperglicemia: ativação da via do polioli; aumento do fluxo da hexosamina; ativação da PKC; aumento da produção de AGEs.**

Os AGEs são gerados por reação de glicação não enzimática, através da redução de glicose, lípidos, e/ou grupos amina presentes em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. A hiperglicemia é considerada o principal evento intracelular que despoleta a formação de AGEs, através do “stress carbonilo”, na qual os elevados níveis de glicose intracelular induzem a formação de intermediários com grupos carbonilo altamente reativos, a partir da decomposição do produto de Amadori a 3-deoxiglucosona, da auto-oxidação da glicose a

glioxal, e da fragmentação do D-gliceraldeído-3-fosfato (*D-glyceraldehyde 3-phosphate*, G-3-P) e da dihidroxiacetona fosfato (*dihydroxyacetone phosphate*, DHAP) em metilglioxal (*methylglyoxal*, MGO). Os grupos carbonilo destes precursores reagem com grupos amins de proteínas, por exemplo, através do resíduo de arginina do MGO com resultante formação de hidroimidazolona derivada de metilglioxal (*methylglyoxal-derived hydroimidazolone*, MG-HI), resultando na formação de AGEs (Brownlee, 2001; Huebschmann et al., 2006; Matafome, Sena e Seíça, 2013).

O metilglioxal é detoxificado pelo sistema da glioxalase, que compreende a GLO1, a glioxalase 2 (*glyoxalase 2*, GLO2) e a glutathione (*glutathione*, GSH). A glioxalase 1 é responsável por catalisar o primeiro passo da detoxificação, no qual ocorre a conversão do MGO-GSH no tioéster S-D-lactoil-glutathione. A glioxalase 2, por sua vez, hidrolisa o tioéster em D-lactato e GSH (Matafome et al., 2017; Nigro et al., 2017). A expressão génica da glioxalase está dependente de elementos de regulação, nos quais se inclui o elemento de resposta antioxidante (*antioxidant response element*, ARE). Em condições de hipoxia, ocorre uma diminuição da produção de ATP pela cadeia respiratória da mitocôndria, pelo que, de forma a compensar, dá-se um aumento glicólise anaeróbica, com a formação de AGEs (Nigro et al., 2017).

A formação dos AGEs provoca dano celular na medida em que altera proteínas intracelulares, modifica componentes da matrix extracelular com conseqüentes alterações na sinalização entre a célula e a matrix. Para além da alteração da função das proteínas, a ativação do recetor dos produtos de glicação avançada (*receptor for advanced glycation end products*, RAGE), resulta na ativação da oxidase da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH, NADP<sup>+</sup> na sua forma oxidada), o que aumenta a formação de ROS, e resulta igualmente na ativação da PKC, proteína p21 e p38, cinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*, ERK), JNK e sirtuína 1 (*sirtuin 1*, Sirt1). Estas proteínas promovem a translocação do fator nuclear kappa B (*nuclear factor-kappa B*, NF-κB) para o núcleo, com conseqüente aumento do processo inflamatório por aumento da transcrição génica de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento em células endoteliais, mesangiais e macrófagos (Brownlee, 2001; He e King, 2004; Kawahito, Kitahata e Oshita, 2009; Matafome et al., 2017; Uribarri et al., 2011).

A via da hexosamina compreende uma pequena fração do fluxo da glicose nos tecidos insulino-dependentes, na qual 2 a 3% da frutose-6-fosfato (*fructose 6-phosphate*, F-6-P), formada no metabolismo da glicose, é convertida a glucosamina-6-fosfato, pela enzima

glutamina:fructose-6-fosfato aminotransferase (*glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase*, GFAT), com posterior conversão a uridina difosfato N-acetilglucosamina (*uridine diphosphate N-acetylglucosamine*, UDP-GlcNAc) e outros açúcares amina. Este produto tem a capacidade de se ligar covalentemente a serinas e treoninas de proteínas específicas, através da UDP-NAc transferase (*O-linked N-acetylglucosamine transferase*, OGT) que catalisa a adição de N-acetilglucosamina numa ligação de O-glicosilação aos resíduos de serina e treonina. Ora, este processo que tem um grande impacto a nível biológico, uma vez que múltiplas vias de sinalização intracelular são reguladas pelo estado de fosforilação dos resíduos de serina ou treonina. Para além disso, o processo de O-glicosilação de fatores de transcrição leva ao aumento da expressão de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente fator de transformação do crescimento  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* , TGF- $\beta$ ) e inibidor do ativador do plasminogénio tipo I (*plasminogen activator inhibitor-1*, PA-I), com implicações cardiovasculares (He e King, 2004; Yki-Järvinen e McClain, 2015).

Na hiperglicemia, o aumento da produção de superóxido inibe a via de glicosilação da pentose fosfato, favorecendo a via da hexosamina. Deste modo, são afetadas vias importantes na patologia da diabetes, como, por exemplo, a sinalização da insulina e a formação de NO pela sintetase do óxido nítrico endotelial (*oxide nitric synthetase*, eNOS) (He e King, 2004; Rolo e Palmeira, 2006; Yki-Järvinen e McClain, 2015).

Na via dos polióis, a glicose é metabolizada a sorbitol pela aldose redutase, acompanhado da oxidação de NADPH a NADP<sup>+</sup>, seguida da transformação de sorbitol em frutose, através da sorbitol desidrogenase, catalisada pela redução do NAD<sup>+</sup> a NADH. O aumento da glicose, com consequente aumento da NADP<sup>+</sup> em relação à NADPH, leva a alteração no equilíbrio de redox intracelular, aumentando o stress oxidativo (He e King, 2004).

A PKC constitui um conjunto de isoformas de serina/treonina cinases, das quais a  $\alpha$ ,  $\beta 1$  e  $2$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  e  $\zeta$  são expressas na vasculatura. A ativação da sua via está associada a vários mecanismos, tais como: aumento da síntese de DAG promovido pelo aumento do ratio NADH/NAD<sup>+</sup>; aumento do stress oxidativo; aumento da expressão de fatores de crescimento; dislipidemia; aumento da formação de AGEs. Na hiperglicemia, observa-se um aumento da ativação desta via de sinalização, com consequências a nível da expressão génica e da vasculatura, induzindo alterações com repercussões que contribuem para o desenvolvimento das lesões vasculares que são observadas na diabetes, tais como diminuição da eNOS e aumento da endotelina-1, do TGF- $\beta$ , e do inibidor do PA-I, com

comprometimento do equilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores (He e King, 2004).

### **1.3. Complicações da DM tipo 2**

A função microvascular encontra-se afetada na diabetes, na medida em que a patologia induz alterações nos capilares dos glomérulos renais, da retina, do miocárdio, da pele e do músculo. Essas alterações levam à deterioração da função dos vasos sanguíneos, com o desenvolvimento de complicações microvasculares, que são uma causa importante de morbidade e mortalidade (Chawla, Chawla e Jaggi, 2016).

Uma vez que, além das células endoteliais, células como os podócitos ou os neurónios, são insulino-independentes e captam glicose por gradiente de concentração, as complicações da diabetes afetam principalmente os olhos, os nervos, os rins e o coração, traduzindo-se em neuropatia, nefropatia, retinopatia e doenças cardiovasculares. Segundo a estimativa da IDF, aproximadamente 50% da população com diabetes, de idade compreendida entre 20 e 79 anos, não estão diagnosticados, o que predispõe a um maior risco de desenvolvimento de complicações (*International Diabetes Federation, 2017*).

Um dos fatores com maior impacto nas complicações microvasculares é a disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia. O aumento da glicose plasmática, pelos mecanismos já mencionados, culmina no aumento do stress oxidativo, levando à diminuição da atividade dos mediadores de vasodilatação, ao aumento da atividade dos vasoconstritores e da formação de moléculas de adesão, como, por exemplo, o CD31. Numa situação crónica, este processo pode levar à perda de viabilidade celular vascular e à oclusão vascular, resultando em edema, hipoxia e isquemia (Brownlee, 2001).

#### **1.3.1. Disfunção endotelial**

A disfunção endotelial associada à DM, resulta não só da hiperglicemia crónica como de outros fatores de risco cardiovascular tais como: hipertensão, dislipidemia, insulino-resistência e obesidade. Estes mecanismos estão subjacentes às alterações no fluxo sanguíneo, ao aumento da permeabilidade vascular, desenvolvimento da aterosclerose e, mais tarde, a acidentes vasculares (Brownlee, 2001; Caballero, 2005).

O endotélio é uma barreira mecânica de separação entre o sangue e os tecidos e uma interface entre o fluxo sanguíneo e as células musculares lisas vasculares. É um órgão com funções parácrina e autócrina atuando na homeostase vascular, regulação do tónus vascular,

proliferação das células do músculo liso vascular, migração de leucócitos, trombose e trombólise (Caballero, 2005; Hadi e Suwaidi, 2007). De forma a controlar o tónus vascular, as células endoteliais libertam mediadores vasoconstritores e vasodilatadores. Nos mediadores vasoconstritores incluem-se a endotelina-I, a angiotensina II, as prostaglandinas, e os tromboxanos, enquanto que, no que diz respeito à vasodilatação, destaca-se o óxido nítrico (Hadi e Suwaidi, 2007).

O óxido nítrico (*nitric oxide*, NO) é um potente vasodilatador, cuja alteração da atividade/síntese tem elevada importância no que se refere à disfunção endotelial. A célula endotelial responde à presença de estímulos químicos que promovem a vasodilatação, tais como acetilcolina, bradicinina, substância P, adenosina difosfato (*adenosine diphosphate*, ADP) e trombina. Perante tais estímulos, ocorre um aumento da atividade da eNOS, a qual catalisa a formação de NO através da conversão de L-arginina em L-citrulina. O NO entretanto formado difunde-se para as células musculares lisas vasculares adjacentes, onde aumenta o monofosfato cíclico de guanosina (*cyclic guanosine monophosphate*, cGMP), que induz relaxamento. Para além disto, o NO previne o crescimento celular, e é captado pelas plaquetas sanguíneas com consequente inibição da agregação plaquetária (Quyyumi, 1998).

Em contrapartida, a endotelina-I (*endothelin-1*, ET-1) é um potente vasoconstritor com efeitos inflamatórios e proliferativos, que tem a capacidade de inibir a eNOS e ativar a NADPH oxidase, aumentando a produção de superóxido, que neutraliza o NO através da formação de peroxinitrito (Maamoun *et al.*, 2019; Zhang, Dellsperger e Zhang, 2012).

A disfunção endotelial é caracterizada por um estado de inflamação crónica no endotélio decorrente do desequilíbrio na homeostase vascular, na qual se observa aumento da produção de fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, e espécies reativas de oxigénio, alterações nos processos associados à coagulação e alterações na angiogénese (Maamoun *et al.*, 2019).

O principal evento que despoleta a disfunção endotelial consiste na diminuição da biodisponibilidade do NO, traduzida pelo equilíbrio entre a sua produção, através da eNOS, e a sua conversão a produtos mais estáveis como nitritos e nitratos. Na hiperglicemia, o stress oxidativo associado ao aumento da produção de superóxido, aumenta a produção de peroxinitrito, com consequente aumento do stress nitrosativo. Este anião está envolvido na nitração da tirosina, levando à formação de nitrotirosina, e participa igualmente na reação com o cofator da eNOS, a tetrahydrobiopterina (*tetrahydrobiopterin*, BH<sub>4</sub>), levando à oxidação do

mesmo. Perante concentrações insuficientes de BH<sub>4</sub>, a eNOS fica desacoplada, doando elétrons para moléculas de oxigênio, formando superóxido em vez de NO, diminuindo a biodisponibilidade deste potente vasodilatador (Pacher, Beckman e Liaudet, 2007; Potenza et al., 2009).

Dos mecanismos de glicotoxicidade referidos, que contribuem para os efeitos da hiperglicemia crônica, o aumento da formação de AGEs, bem como do seu precursor metilglioxal, está largamente associado ao aumento do stress oxidativo, contribuindo para a alteração da função endotelial (Matafome et al., 2017; Nigro et al., 2017).

De forma a diminuir os AGEs formados, a ligação do fator induzível por hipoxia I (*hypoxia-inducible factor-1*, HIF-1 $\alpha$ ) aos ARE despoleta a expressão de glioxalase e do fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) (Nigro et al., 2017). Contudo, o metilglioxal altera a capacidade do HIF-1 $\alpha$  e do seu co-ativador p300 se ligarem ao DNA, com consequente alteração da transcrição gênica e diminuição da produção de glioxalase e do VEGF. Estas alterações vão induzir dano a nível vascular, contribuindo para a disfunção endotelial e para a formação anormal de vasos sanguíneos. Por outro lado, o metilglioxal aumenta a formação de espécies reativas, diminui a capacidade antioxidante das células, diminui os níveis de GLO1 e aumenta a atividade de enzimas pro-oxidantes, o que contribui para a deterioração da função endotelial (Matafome et al., 2017; Matafome, Sena e Seíça, 2013).

A resistência à insulina também tem repercussões no deterioramento da função endotelial. A insulina, paralelamente aos efeitos metabólicos, também atua a nível hemodinâmico, na medida em que aumenta a biodisponibilidade do NO. Como tal, estimula a vasodilatação e aumenta o fluxo sanguíneo local, o que, por sua vez, melhora a distribuição e exposição da insulina aos tecidos. Sob condições de insulino-resistência, nas quais se verifica um aumento do fluxo de glicose e FFA, acompanhado de um estado pró-inflamatório, pode ocorrer um aumento da formação de ROS, o que contribui para a deterioração da função endotelial e da função hemodinâmica (Cersosimo e DeFronzo, 2006; Katakam et al., 2009).

Por outro lado, a disfunção endotelial altera a microcirculação em tecidos metabolicamente ativos, como o tecido adiposo, com consequências negativas para a chegada da insulina aos tecidos e para a ação da mesma, o que permite concluir que a disfunção endotelial é ao mesmo tempo uma causa e uma consequência dos distúrbios metabólicos (Cersosimo e DeFronzo, 2006; Rodrigues, Matafome e Seíça, 2014).

## 2. Curcumina

### 2.1. Origem e descoberta da curcumina

O mundo da suplementação encontra-se em franca expansão e são já muitos os nutracêuticos que, em diversos contextos patológicos, detêm evidência científica comprovada.

O uso de compostos naturais despertaram um enorme interesse na investigação científica uma vez que possuem propriedades particularmente relevantes, tais como: poucos efeitos adversos, baixo custo e grande abundância (Ghosh, Banerjee e Sil, 2015).

O açafrão-da-terra, derivado da *Curcuma longa*, é identificado como um desses compostos, e já vem sendo utilizado há longos anos na medicina tradicional, na culinária, como cosmético e até mesmo como corante amarelo para têxteis. Na culinária este composto é utilizado como especiaria dietética, contudo é mais conhecido em combinação com outras especiarias, das quais é exemplo o caril (Aggarwal *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2012).

Na medicina tradicional, como agente terapêutico, tem sido usado por via sistêmica para tratar febres, problemas digestivos, diarreia, azia, alergias, flatulência, distúrbios biliares e hepáticos, anorexia, tosse, feridas diabéticas, reumatismo, sinusite, entre outras. Por via tópica tem sido utilizado para reduzir a inflamação e o inchaço resultante de entorses, cortes e contusões (Ammon e Wahl, 1991; Ravindran, 2007).

As origens do açafrão-da-terra estão fortemente associadas com a cultura da população do subcontinente Indiano, sendo considerado o seu país nativo, onde ocorre a maior produção, consumo e exportação. Contudo, é igualmente cultivado em Bangladesh, China, Tailândia, Camboja, Malásia, Indonésia e Filipinas. Paralelamente a estes locais, nas regiões tropicais da África, América e Ilhas do Oceano Pacífico também é cultivado, porém em menor escala (Ravindran, 2007).

Há dois séculos atrás, Vogel e Pelletier foram os primeiros a isolar o composto de coloração amarela do rizoma da *Curcuma longa*, denominando-o curcumina, o qual foi classificado como o principal polifenol encontrado nessa parte da planta e foi reconhecido como o polifenol responsável pelos efeitos terapêuticos do açafrão-da-terra (Vogel e Pelletier, 1915). Perante esta descoberta, foram vários os estudos científicos elaborados de forma a descobrir a estrutura química da molécula. Em 1910, Milobedzka e Lampe identificam a sua fórmula como difluoroilmetano (Milobedzka, Kostanecki e Lampe, 1910).

Tradicionalmente, os usos do açafrão-da-terra na terapêutica evidenciaram uma possível capacidade deste em modelar várias vias de sinalização, despertando interesse na investigação científica. Em 1949, Schraufstatter e os seus colaboradores constataram que a curcumina é um composto biologicamente ativo que tem propriedades antibacterianas (Schraufstatter e Bernt, 1949). Desde então, os diversos estudos realizados demonstraram que este polifenol possui igualmente propriedades anti-inflamatórias, hipoglicêmicas, antioxidantes, cicatrizantes, antivirais, anticoagulantes, entre outras (Chattopadhyay et al., 2004).

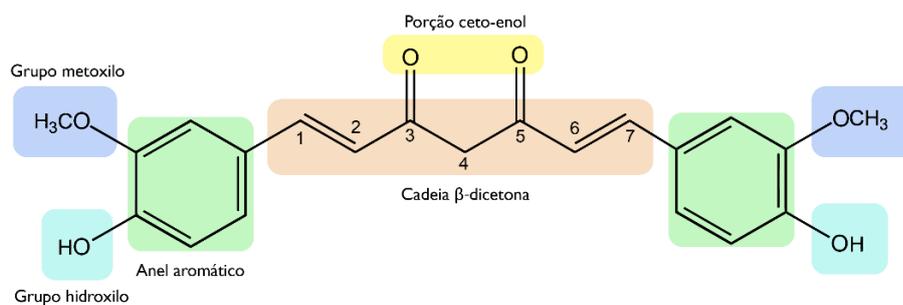
Uma vez que as doenças têm um carácter heterogêneo, cada vez mais há a necessidade de apostar em moléculas que tenham efeitos pleiotrópicos.

## 2.2. Propriedades químicas e biológicas

A curcumina é uma molécula simétrica com as seguintes características: nome IUPAC (1E,6E)-1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona; número CAS: 458-37-7; fórmula química  $C_{21}H_{20}O_6$ ; peso molecular de 368,39 g/mol; ponto de ebulição de 170-175 °C (Esatbeyoglu et al., 2012; Priyadarsini, 2013, 2014).

Este polifenol é praticamente insolúvel em água, porém é facilmente solúvel em solventes apolares tais como dimetilsulfóxido (*dimethyl sulfoxide*, DMSO), acetona, metanol, etanol, acetonitrilo, clorofórmio, acetato de etilo, óleos, entre outros (Priyadarsini, 2014).

A composição da curcumina encontrada na natureza compreende a curcumina I (94%), a curcumina II (6%) e a curcumina III (0,3%). A sua cor amarela é resultado da conjugação da ligação dupla e do arranjo simétricos dos dois cromóforos da estrutura (Chattopadhyay et al., 2004; Esatbeyoglu et al., 2012). A sua estrutura é caracterizada por dois anéis aromáticos com grupos metóxi e grupos fenólicos, ligados por uma cadeia de sete carbonos que corresponde à cadeia  $\beta$ -dicetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (figura 2). A reatividade da curcumina é determinada por esses três grupos reativos, os quais têm três prótons lábeis sujeitos ao equilíbrio protónico (Anand et al., 2008; Priyadarsini, 2014).



**Figura 2 - Estrutura química da Curcumina e respetivos grupos reativos.**

As reações químicas com repercussões na atividade biológica da curcumina são a reação de desprotonação (doação de hidrogénio) que culmina na oxidação da molécula, reação de Michael (adição nucleofílica), hidrólise, degradação e reações enzimáticas (Anand *et al.*, 2008; Priyadarsini, 2014).

No organismo, uma das reações mais importantes da curcumina é a reação com as ROS, na qual ocorre ativação ou redução do oxigénio, quer através da perda protónica ou através da transferência de eletrões. Os três grupos reativos da curcumina podem sofrer essas reações, ficando a molécula na sua forma oxidada. No entanto, diversos estudos e cálculos teóricos efetuados indicam que o grupo hidroxilo é o grupo mais ácido e, portanto, tem mais tendência a sofrer perda protónica. É, no entanto, necessário ter em conta que essa tendência está dependente da interação da ligação de hidrogénio da molécula entre os grupos hidroxilo e os grupos metóxi, que influencia a energia de ligação oxigénio-hidrogénio e a predisposição na perda do hidrogénio pelos radicais livres (Anand *et al.*, 2008; Priyadarsini, 2014).

Paralelamente, a reação de adição nucleofílica, também denominada reação de Michael, é igualmente fundamental para explicar a ação biológica do polifenol. Nesta reação, a cadeia β-dicetona α,β-insaturada funciona como um aceitador, reagindo com os grupos -OH, -SH e -SeH, que desempenham a função de dadores. Assim sendo, esta reação possibilita que a curcumina reaja com tióis e selenóis, o que tem consequências a nível biológico (Priyadarsini, 2014).

A molécula exibe tautomerismo ceto-enol, definido como um estado de equilíbrio entre a forma ceto e a forma enol, estabilizado por uma ligação de hidrogénio, no qual o equilíbrio tautométrico está dependente da polaridade, do pH e do estado do ambiente químico. Relativamente ao pH, apresenta-se na sua forma ceto em soluções ácidas e neutras, atuando como um dador de protões, e em condições alcalinas exibe forma enol, atuando como um dador de eletrões. No que diz respeito à polaridade, num solvente não polar e

moderadamente polar, é mais estável na forma enólica, e num solvente polar é mais estável na forma ceto (Aggarwal *et al.*, 2007; Esatbeyoglu *et al.*, 2012; Ghosh, Banerjee e Sil, 2015; Priyadarsini, 2014).

### **2.3. Biodisponibilidade e segurança**

Existem imensos produtos naturais que contêm diversos compostos biologicamente ativos, que podem causar efeitos adversos graves e inclusive interagir farmacologicamente com outros medicamentos ou suplementos, causando efeitos indesejáveis. Contudo, os vários estudos realizados com a curcumina, quer pré-clínicos quer clínicos, permitiram inferir que é uma molécula extremamente segura e potencialmente efetiva, considerada pela *Food and Drug Administration* como “*Generally Regarded As Safe*” (GRAS), e cuja dose de 0.1-3 mg/kg de peso corporal foi classificada como aceitável pela *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* em 1996 (“*Clinical development plan: curcumin.*” 1996; Shatadal Ghosh *et al.*, 2015).

Nos estudos clínicos de segurança realizados com a curcumina não se verificaram efeitos tóxicos graves com administração de doses moderadamente elevadas, o que indica que o polifenol é muito bem tolerado (Aggarwal, Kumar e Bharti, 2002; Chainani-Wu, 2003; Cheng *et al.*, 2001). Contudo, foram identificados alguns efeitos adversos de menos graves tais como diarreia, dores de cabeça, erupções cutâneas, fezes de cor amarelada e náuseas. Para além disso, foi detetado um aumento dos níveis de fosfatase alcalina sérica e na desidrogenase láctica sérica em análises ao sangue (Lao *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2004). Adicionalmente, em doses extremamente altas, Prasad e os seus colaboradores relataram que a curcumina provocou efeitos ulcerogénicos, onde se verificou a ocorrência de ulceração gástrica (Prasad *et al.*, 1979).

A segurança e forte atividade intrínseca do polifenol são uma evidência do seu potencial para o tratamento e prevenção de diversas doenças. Tal traduz uma grande vantagem visto que os anti-inflamatórios disponíveis para tratamento farmacológico, tanto os esteroides como os não esteroides, estão associados a uma enorme quantidade de efeitos adversos, o que impõe uma grande necessidade de descoberta e desenvolvimento de terapêuticas mais seguras que possam substituir o uso das convencionais (Aggarwal *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2007; Prasad, Tyagi e Aggarwal, 2014).

Apesar da sua segurança e da atividade intrínseca, a curcumina ainda não foi aprovada como um agente terapêutico devido à sua fraca solubilidade em solução aquosa, intensa coloração e biodisponibilidade reduzida (Aggarwal *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2007; Pan, Huang e Lin, 1999; Prasad, Tyagi e Aggarwal, 2014).

A baixa biodisponibilidade oral foi demonstrada pelos estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção que revelaram que a molécula possui fraca absorção traduzida pelos baixos níveis de fármaco no sangue, limitada distribuição pelos tecidos, rápido metabolismo hepático, rápida eliminação pela bÍlis e tempo de meia-vida reduzido, o que encurta drasticamente a concentração disponível para exercer efeito terapêutico no organismo (Aggarwal *et al.*, 2007; Anand *et al.*, 2007; Pan, Huang e Lin, 1999; Prasad, Tyagi e Aggarwal, 2014). Apesar de ainda não estar bem elucidada, a baixa concentração do polifenol no sangue, pode resultar da sua elevada metabolização hepática e a extensa biotransformação intestinal (Lao *et al.*, 2006).

Numa investigação no âmbito da caracterização farmacocinética da curcumina constataram que sua biotransformação no organismo ocorre durante a fase de absorção (Ravindranath e Chandrasekhara, 1981). No processo de metabolização hepática, a curcumina sofre reações de conjugação de fase II com o ácido glucurónico e com o sulfato, e posterior reação de redução culminando na formação dos metabolitos tetra-hidrocurcumina, hexahidrocurcumina e hexahidrocurcuminol (Ireson *et al.*, 2002).

## **2.4. Atividades biológicas**

### **2.4.1. Propriedades antioxidantes**

Muitos dos compostos naturais bioativos que têm suscitado interesse na comunidade científica, possuem em comum propriedades antioxidantes significativas. Esses compostos são particularmente promissores uma vez que existem diversas doenças cuja fisiopatologia engloba o aumento da formação de ROS, provocando um desequilíbrio a favor dos oxidantes em relação ao sistema de defesa do organismo, com consequente stress oxidativo (Ghosh, Banerjee e Sil, 2015).

A curcumina não é exceção, na medida em que as suas propriedades antioxidantes são consideradas um dos fatores determinantes da sua ação terapêutica. O polifenol, ao contrário da maior parte dos antioxidantes naturais, possui ambos os grupos químicos que proporcionam capacidade de sequestrar espécies reativas, um grupo fenólico e um grupo  $\beta$ -dicetona, dependendo a sua ação do equilíbrio ceto-enol da molécula (Ghosh, Banerjee e Sil, 2015; Priyadarsini, 1997).

A peroxidação lipídica é um dos processos prejudiciais à viabilidade celular que tem por base as espécies reativas. Este processo diz respeito à reação em cadeia dos ácidos gordos

polinsaturados das membranas celulares, que, por conseguinte, são particularmente sensíveis à peroxidação, com a formação de radicais livres que atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas do organismo, alterando a integridade, potencial, permeabilidade e fluidez das membranas (França *et al.*, 2013; Gutteridge, 1995; Halliwell e Whiteman, 2004; Shalini e Srinivas, 1987).

No entanto, a peroxidação está igualmente associada a lesões oxidativas quando ocorre um desequilíbrio na produção de ROS. Este desequilíbrio traduz-se em efeitos prejudiciais na membrana, tais como aumento da permeabilidade ao H<sup>+</sup> e outros iões, falha no potencial da membrana, e possível rutura da mesma, com consequente libertação do conteúdo da célula ou com consequentes efeitos nefastos nas biomoléculas, levando à oxidação destas com perda de função biológica (França *et al.*, 2013; Gutteridge, 1995; Halliwell e Whiteman, 2004; Shalini e Srinivas, 1987). Perante certas situações de dano celular, nas quais ocorre, por exemplo, inativação ou diminuição de antioxidantes da célula, a célula aumenta o processo de peroxidação lipídica, com consequente aumento do stress oxidativo (Gutteridge, 1995). Estudos anteriores verificaram que a administração de curcumina diminui a peroxidação lipídica em consequência da sua capacidade de sequestrar ROS (Priyadarsini, 1997; Shalini e Srinivas, 1987; Soudamini *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 2006).

Paralelamente ao mecanismo antioxidante elucidado, foi igualmente relatado para a curcumina um mecanismo de ação via ativação do fator 2 relacionado com o fator nuclear eritroide (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2). O Nrf2 é um fator de transcrição sensível a reações redox, que regula a expressão génica de enzimas antioxidantes, tais como a SOD e a catalase, e que, perante condições basais, encontra-se no citoplasma fortemente ligado ao seu inibidor, a proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (*Kelch-like ECH-associated protein 1*, Keap1). Por sua vez, este o Keap1 direciona este fator de transcrição para a ubiquitinação e degradação no proteossoma, inibindo a sua atividade (Esatbeyoglu *et al.*, 2012; Wakabayashi *et al.*, 2004).

Na presença de indutores do Nrf2, estes reagem com 2 resíduos de cisteína do Keap1 através da formação de pontes dissulfeto intermoleculares, o que desacopla o complexo Nrf2-Keap1, permitindo a translocação do Nrf2 para o núcleo. Após esse processo, o fator nuclear liga-se às proteínas Maf, ao cofator CBP/p300 e aos ARE do DNA, formando um heterodímero, ao qual se segue a expressão do gene alvo (Esatbeyoglu *et al.*, 2012; Wakabayashi *et al.*, 2004).

Num estudo com células epiteliais, foi demonstrado que a curcumina aumenta significativamente a expressão da proteína heme oxigenase I (HO-1). Esta proteína é responsável pela proteção contra várias formas de stress, sendo codificada pelo gene *ho-1* cuja expressão génica é induzida pelo Nrf2 (Balogun *et al.*, 2003). Para além disso, nesse estudo concluíram ainda que a curcumina estimula a atividade do gene *ho-1* a partir da inativação do complexo Nrf2-Keap1, levando ao aumento da ligação do Nrf2 aos ARE (Balogun *et al.*, 2003). O mesmo foi verificado num estudo realizado com células hepáticas (Balstad *et al.*, 2011). Assim sendo, estes estudos sugerem que a curcumina induz o Nrf2, desencadeando uma cascata que culmina na expressão de enzimas que atuam na defesa antioxidante da célula.

#### **2.4.2. Propriedades anti-inflamatórias**

Para além da atividade antioxidante, estão igualmente descritas propriedades anti-inflamatórias, com inibição da via de sinalização do NF- $\kappa$ B e inibição da expressão da ciclooxigenase (*cyclooxygenase*, COX) e da lipoxigenase (*lipoxigenase*, LOX) (Rao, 2007; Singh e Aggarwal, 1995).

O NF- $\kappa$ B é ativado por estímulos inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias e lipopolissacarídeos (*lipopolysaccharide*, LPS) bacterianos, com consequente translocação para o núcleo e expressão génica de genes-alvo, tais como Fatores de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) e interleucinas (Ghosh e Hayden, 2008). A curcumina atua nesta via de sinalização, a partir da atividade dos metabolitos formados na sua reação de degradação (Edwards *et al.*, 2017).

A principal via de degradação do polifenol em pH fisiológico *in vitro* é a reação de auto-oxidação, no qual a molécula é degradada em metabolitos reativos que atuam como mediadores dos efeitos anti-inflamatórios (Gordon, O. N. *et al.*, 2015). A oxidação resulta na formação do produto final de auto-oxidação, a biciclopentadiona (Gordon, O. N. *et al.*, 2015; Gordon, Odaine N. *et al.*, 2015). Os intermediários formados nesta reação ligam-se a proteínas celulares, interferindo, inclusive, na atividade da I $\kappa$ B cinase  $\beta$  (*I $\kappa$ B kinase  $\beta$* , IKK $\beta$ ), que é essencial para a ativação da via do NF- $\kappa$ B (Edwards *et al.*, 2017). A ligação covalente da cisteína 179 (Cys179), presente na IKK $\beta$ , aos metabolitos reativos da auto-oxidação da curcumina impede a fosforilação da IKK $\beta$  e inibe a sua atividade, levando à supressão da sinalização do NF- $\kappa$ B (Aggarwal *et al.*, 2006; Byun, Choi e Jue, 2006; Delhase *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 2017; Jobin *et al.*, 1999).

Um estudo realizado com uma linha celular de macrófagos, com o objetivo de avaliar o possível efeito anti-inflamatório do produto da transformação oxidativa, confirmou o papel fulcral dos intermediários reativos em realizar essa função, uma vez que foi verificado que a biciclopentadiona foi incapaz de se ligar ao péptido e inibir o NF- $\kappa$ B, comprovando o efeito anti-inflamatório (Sanidad *et al.*, 2016).

Ainda no que diz respeito às propriedades anti-inflamatórias, existem outros mecanismos associados. Há evidências que sugerem que a curcumina inibe a expressão da COX (Zhang *et al.*, 1999). Das isoformas da COX envolvidas no processo inflamatório, a curcumina inibe seletivamente a ciclooxygenase-2 (COX-2), através da modulação da expressão génica desta isoforma e, igualmente, através da inibição direta da sua atividade o que, conseqüentemente, suprime a síntese de prostaglandinas, contribuindo para a diminuição dos mediadores de inflamação (Goel, Boland e Chauhan, 2001; Zhang *et al.*, 1999).

Para além da influência nas COX, a regulação das LOX é igualmente alterada pelo polifenol. As LOX estão envolvidas na formação de metabolitos do ácido araquidónico, cujos metabolitos finais são leucotrienos e lipoxinas. Os leucotrienos são particularmente relevantes, devido à sua ação no processo inflamatório, desempenhando a função de mediadores inflamatórios (Rao, 2007). Vários estudos mostraram que o polifenol inibe a LOX, quer *in vitro* quer *in vivo*, inibindo conseqüentemente a cascata de sinalização desta enzima. Assim, é de referir que a inibição das vias da LOX e COX pela curcumina pode atuar sinergicamente e culminar num aumento da atividade anti-inflamatória (Rao, 2007).

#### **2.4.3. Propriedades antidiabéticas**

As propriedades antidiabéticas da curcumina estão largamente associadas aos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Tais propriedades são cruciais para elucidar a ação do polifenol na DM (Aggarwal e Harikumar, 2009).

O stress oxidativo é um dos processos que mais contribui para a patogénese da diabetes, na medida em que a formação de ROS e a diminuição da defesa antioxidante contribuem para o desenvolvimento das suas complicações (Nabavi *et al.*, 2015).

Em diversos estudos concluíram que a curcumina atua de forma idêntica às enzimas antioxidantes endógenas, neutralizando os ROS tais como superóxido, peroxinitrito e peróxido de hidrogénio, aquando da produção excessiva destes. Tal é suportado por evidências científicas que reportam diminuição da formação de ROS nos ilhéus de Langerhans

e inibição da apoptose celular, o que se traduz numa melhoria do estado antioxidante das células e na melhoria da secreção de insulina (Bayrak *et al.*, 2008; Meghana, Sanjeev e Ramesh, 2007; Shahed, Jones e Shoskes, 2001; Sharma, Kulkarni e Chopra, 2006).

Tal como foi já referido, a acumulação de AGEs induzida pela hiperglicemia e pelo stress oxidativo também está envolvida na patogénese da diabetes. Foi postulado que a atividade hipoglicemiante do polifenol pode igualmente ser justificada pela sua ação supressora na formação de AGEs (Nabavi *et al.*, 2015). Os autores sugeriram que tal acontece devido ao aumento da síntese de glutathione e devido à ativação do PPAR $\gamma$ , o que resulta na diminuição da formação de AGEs e da expressão dos RAGE (Nabavi *et al.*, 2015).

Ainda na que diz respeito às propriedades hipoglicémicas, estudos realizados com a curcumina demonstraram que o polifenol tem a capacidade de modular a expressão génica e aumentar a translocação do GLUT4, com conseqüente redução da glicemia (Chauhan *et al.*, 2018; Na *et al.*, 2011).

As propriedades anti-inflamatórias são igualmente responsáveis pelos efeitos benéficos da curcumina. Efetivamente, em linhas celulares humanas de mieloma e em ratos fêmeas C57BL6/J alimentados com dieta gorda, aos quais foi induzida esteato-hepatite, foi demonstrado que a curcumina inibe a ativação do NF- $\kappa$ B (Bharti *et al.*, 2003; Leclercq *et al.*, 2004).

## **2.5. Derivados da Curcumina**

Tal como mencionado na secção 2.3, o maior obstáculo do uso clínico da curcumina é a sua baixa biodisponibilidade devido à absorção baixa, metabolismo rápido e excreção rápida, o que se traduz na diminuição da sua atividade biológica, limitando a sua aplicação. Como tal, o aumento da biodisponibilidade tem sido tentado, através de várias abordagens, das quais se podem destacar as modificações na estrutura química, através de substituições, adições ou eliminações de grupos na molécula, estratégias que visam fornecer um sistema de entrega do composto sem alterar a sua atividade, como as nanopartículas, lipossomas e micelas, bem como outros métodos como o uso de adjuvantes ou a síntese de bioconjugados. Estas estratégias foram implementadas em diversos estudos pré-clínicos e algumas em estudos clínicos, os quais fornecem uma elevada evidência de que o aumento da biodisponibilidade pode resolver a baixa bioatividade do polifenol (Fan *et al.*, 2013; Tomeh, Hadianamrei e Zhao, 2019).

As modificações da estrutura química têm por base alterações nos farmacóforos, nomeadamente no grupo dador de hidrogénio, na cadeia dicetona e nos anéis aromáticos ou nos respetivos grupos, o que pode influenciar a atividade farmacológica da molécula e as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, levando a um aumento da eficácia, da solubilidade aquosa e/ou um aumento da estabilidade (Tomeh, Hadianamrei e Zhao, 2019). Para um estudo de angiogénese realizado com modelos *in vitro*, utilizando células endoteliais da veia umbilical humana (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) e células do glioblastoma humano U87MG, e um modelo *in vivo* de murganhos C57BL/6, foi sintetizado um derivado, ao qual foram adicionados dois grupos metilo em posições diferentes, aumentando o impedimento estereoquímico da molécula, com consequente redução do metabolismo. O derivado apresentou melhor capacidade antiangiogénica do que a curcumina, o que é coerente com a modificação, refletindo a diminuição do seu metabolismo pelo organismo (Koo *et al.*, 2015). Yong Pan e seus colaboradores conduziram igualmente um estudo no qual o derivado resultava da eliminação da cadeia  $\beta$ -dicetona e na adição de átomos de bromo à molécula. O derivado apresentou um melhor perfil farmacocinético e uma melhoria na atividade anti-inflamatória. Posteriormente, através da utilização de ratos machos Sprague-Dawley (SD) diabéticos induzidos pela administração de estreptozotocina (*streptozotocin*, STZ), verificaram que o derivado diminuiu os mediadores inflamatórios no soro, no rim e no coração e diminuiu a infiltração renal de macrófagos, acompanhado de uma atenuação das lesões renais e cardíacas induzidas pela diabetes (Pan *et al.*, 2013). Outra abordagem para a melhoria da biodisponibilidade é a utilização da curcumina ligada a metais na forma de complexos. Vários metais podem ser utilizados para formar complexos com a curcumina, através da cadeia  $\beta$ -dicetona, proporcionando uma maior estabilidade à molécula. Por exemplo, um estudo visou a avaliação de um complexo de zinco e curcumina, demonstrando *in vitro* e *in vivo* que o complexo melhora a solubilidade, a estabilidade e os efeitos farmacodinâmicos, em comparação com a curcumina (Sareen, Jain e Dhar, 2016; Shakeri *et al.*, 2019).

Relativamente aos sistemas de entrega da curcumina, os lipossomas são vesículas compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, que se podem associar a moléculas, por encapsulamento dentro da cavidade interna, ou por interações covalentes e electroestáticas. Desta forma, os lipossomas podem comportar-se como estruturas que aumentam a longevidade da molécula associada, e não acarretam efeitos prejudiciais ao organismo, sendo largamente utilizados em investigação, terapêutica e diagnóstico (Edwards e Baeumner, 2006). Num estudo com ratos Wistar-Bratislava diabéticos induzidos com STZ, os

animais tratados com curcumina em lipossomas apresentaram uma melhoria do estado inflamatório e oxidativo (Bulboacă *et al.*, 2019). Por outro lado, Kanai e seus colaboradores desenvolveram uma nanopartícula de curcumina, tendo sido submetida a estudos de farmacocinética em indivíduos saudáveis e em doentes com cancro. A nanopartícula aumentou os níveis de curcumina no plasma e, em concentrações elevadas, não aumentou a incidência de efeitos adversos (Kanai *et al.*, 2012, 2013).

Relativamente à utilização de adjuvantes, a estratégia foca-se na administração concomitante de uma molécula que altere o metabolismo, de forma a aumentar a biodisponibilidade. Exemplos desta estratégia, são a utilização de piperina e de quercetina, as quais já foram testadas em estudos de farmacocinética, demonstrando um aumento dos níveis plasmáticos de curcumina (Shoba *et al.*, 1998; Suresh e Srinivasan, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Os bioconjugados são outra abordagem estratégica, na qual a conjugação confere melhorias a nível da biodisponibilidade, e conseqüente aumento da eficácia. São diversos os estudos nos quais foram desenvolvidos e testados bioconjugados da curcumina, tendo sido obtidos resultados promissores ao nível da melhoria da ação biológica da molécula (Kumar *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010).

Apesar de todo o esforço no desenvolvimento de derivados com o propósito da melhoria das propriedades físico-químicas e biológicas da curcumina, os derivados sintetizados até ao momento apresentam problemas no que toca à potência, eficácia e/ou biodisponibilidade. Outra questão pertinente é que são necessárias doses muito elevadas dos derivados e da própria curcumina para se obter uma resposta terapêutica eficaz, o que pode aumentar os efeitos adversos e reduzir a adesão à terapêutica por parte do doente. Embora várias abordagens por parte da química medicinal tenham sido colocadas em prática, a maioria permaneceu nos estudos pré-clínicos pelo que esta estratégia aplicada para a curcumina carece de mais investigação.

# **Capítulo II**

## **Enquadramento do estudo**

## Enquadramento do Estudo

A curcumina, devido à sua elevada atividade intrínseca, é reconhecida e utilizada em todo o mundo, porém a sua baixa biodisponibilidade é a maior limitação do seu uso. Como tal, de forma a potenciar os seus efeitos, a Professora Doutora Maria Paula Robalo e a Professora Doutora Fátima Piedade, do Centro de Química Estrutural (CQE), Complexo I, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, desenvolveram, por síntese química, quatro derivados da curcumina, para além da síntese da própria molécula de referência, os quais estão representados na tabela I.

Derivado	Estrutura	Fórmula	MM (g/mol)	Ceto/enol (%)
Curcumina		$C_{21}H_{20}O_6$	368,39	0 / 100
Derivado 20		$C_{21}H_{20}O_6$	368,39	0 / 100
Derivado 27		$C_{27}H_{30}O_8$	482,53	35 / 65
Derivado 45		$C_{23}H_{22}O_8$	426,42	54 / 46
Derivado 65		$C_{23}H_{24}O_8$	428,44	0 / 100

**Tabela I – Derivados da curcumina sintetizados pela Professora Doutora Maria Paula Robalo e pela Professora Doutora Fátima Piedade, do CQE, Complexo I, Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa.**

De forma a selecionar os derivados mais promissores, foram realizados estudos piloto *in vitro* e *in vivo*.

Relativamente aos estudos *in vitro*, foi realizado um ensaio para avaliar a atividade anti-inflamatória dos derivados numa linha celular de macrófagos RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) na presença de LPS, na qual, utilizando o reagente de Geiss, foi avaliada a formação de óxido nítrico. O Derivado 27 foi o que apresentou uma maior diminuição da produção de óxido nítrico, na ordem dos 81%, ao qual se seguiu o Derivado 20 com uma percentagem de inibição de, aproximadamente 76% (dados não apresentados). Foi também realizado o ensaio de avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS, no qual se verificou que a curcumina e o Derivado 65 apresentaram a maior percentagem de inibição da formação do radical catião ABTS<sup>+</sup> e, paradoxalmente, os Derivados 20 e 27 apresentaram menor percentagem de captação do H<sup>+</sup> pelo ABTS, com 61 e 73,7%, respetivamente (dados não apresentados) (Lopes, 2018).

Os estudos *in vivo*, foram realizados em ratos GK, os quais foram submetidos a administrações subcutâneas de curcumina e dos derivados em doses equimolares (35 µmol/dia), uma vez por dia, bem como do veículo (DMSO), durante três dias. Foram realizadas medições da glicemia com 6 horas de jejum e realizado o teste de tolerância à insulina (TTI) no final do tratamento. Os Derivados 45 e 65 apresentaram valores médios superiores de glicemia em jejum, 246 e 244 mg/dL, relativamente ao grupo Veículo, 177 mg/dL respetivamente, e da área sob a curva (*area under a curve*, AUC) calculada a partir do TTI, 607 e 545, relativamente ao grupo Veículo, 383, respetivamente, o que invalidou um possível efeito metabólico. No que diz respeito à curcumina e aos Derivados 20 e 27, observou-se uma melhoria no perfil glicémico em relação ao grupo Veículo. É ainda de realçar que o derivado 27 apresentou uma diminuição significativa da glicemia ao longo do TTI, realçando um possível efeito hipoglicémico, o que não foi verificado tão acentuadamente com os outros derivados.

Como tal, estes estudos permitiram concluir que o Derivado 20 e o Derivado 27 seriam os mais promissores para avançar para estudos mais robustos.

# **Capítulo III**

## **Objetivos**

## Objetivos

Tendo em vista o enquadramento do estudo, e uma vez que o nosso foco incidiu na T2DM e suas complicações, o objetivo principal deste estudo consistiu na avaliação dos efeitos do Derivado 20 e do Derivado 27, em tecidos não insulino-dependentes e insulino-dependentes num modelo animal de T2DM. Assim sendo, podemos identificar como objetivos:

- Avaliar os efeitos do tratamento com os derivados da curcumina no perfil glicémico e lipídico num modelo de T2DM;
- Avaliar o efeito do tratamento com os derivados da curcumina na resposta de relaxamento NO-dependente induzida pela ACh da aorta isolada dos animais em estudo, através da realização de curvas cumulativas concentração-resposta à ACh na presença e na ausência do antioxidante ácido ascórbico, bem como da avaliação das vias de sinalização envolvidas no vasorrelaxamento e marcadores histológicos de stress nitrosativo;
- Estudar o efeito do tratamento com os derivados da curcumina na sinalização periférica da insulina e vias de detoxificação, bem como marcadores histológicos de stress oxidativo no tecido adiposo epididimal, rim e fígado.

# **Capítulo IV**

## **Materiais e métodos**

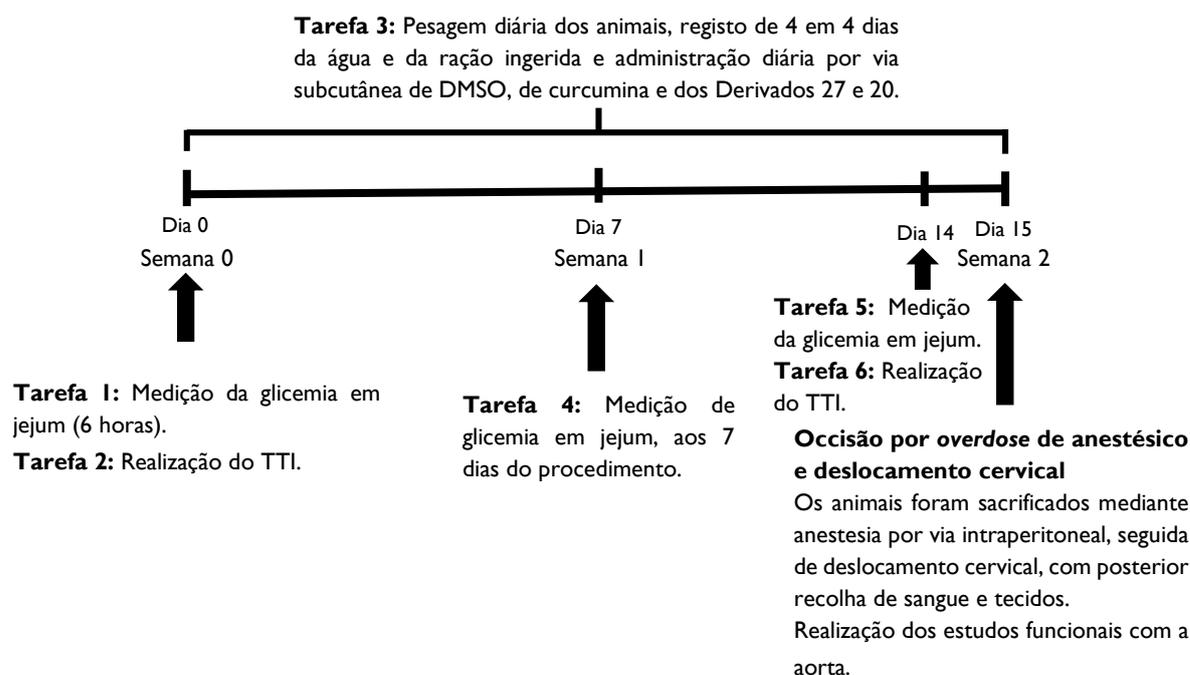
## I. Estudos *in vivo* - Modelo animal

Neste trabalho laboratorial foram utilizadas duas estirpes de ratos com 14 semanas de idade, ratos *Wistar* (W) e ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo animal não obeso de diabetes tipo 2. Ambas as estirpes foram provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e mantidos sob condições controladas de ventilação, temperatura (entre 22 e 22°C), humidade (50-60%), e ciclo de luz/obscuridade de 12 horas, com acesso livre a água e a ração standard para roedores (*standard diet A03*, SAFE, Barcelona).

Os animais foram subdivididos em cinco grupos, os quais foram submetidos a estudo entre as 14 e as 16 semanas (n=4-9/grupo) de idade:

- Ratos *Wistar* usados como grupo controlo (W)(n=5);
- Ratos GK usados como grupo controlo diabético não obeso (GK)(n=9);
- Ratos GK submetidos a injeção subcutânea diária de DMSO, usados como grupo controlo do veículo (Veículo)(n=5);
- Ratos GK submetidos a injeção subcutânea diária de curcumina (40 mg/Kg), (n=4);
- Ratos GK submetidos a injeção subcutânea diária do Derivado 27 (52,4 mg/Kg), (n=4);
- Ratos GK submetidos a injeção subcutânea diária do Derivado 20 (40mg/Kg), (n=4).

Os grupos W e GK não foram submetidos a qualquer tipo de tratamento, enquanto que o grupo Veículo foi submetido a administração subcutânea de 100 µL de DMSO, uma vez por dia. Os animais dos grupos curcumina, Derivado 27 e Derivado 20 foram submetidos a uma injeção subcutânea da mesma quantidade equimolar (35 µmol/dia) de curcumina e Derivado 20 (40 mg/kg/dia) ou de Derivado 27 (52,4 mg/kg/dia). Todo este procedimento foi realizado num período de 14 dias, uma vez que a última dose administrada foi no dia anterior ao sacrifício.



**Figura 3 - Protocolo experimental do estudo *in vivo*.**

Os protocolos experimentais (figura 3) com os modelos animais foram previamente aprovados pelo Órgão responsável pelo bem-estar dos animais (ORBEA) do estabelecimento onde os animais estiveram alojados, tendo sido seguidas igualmente as recomendações internacionais de utilização e manutenção de animais de laboratório. Todos os procedimentos com os animais foram realizados por investigadores devidamente creditados para o efeito (Curso válido pela Federação Europeia das Associações de Ciências em Animais de Laboratório – *Federation for European Laboratory Animal Science Association, FELASA* - com certificação da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária).

## 2. Análise sistémica *in vivo*

### 2.1. Monitorização do peso

A monitorização da ração e da água ingerida iniciou-se na 14<sup>a</sup> semana de idade em todos os grupos (Figura 2). Esta monitorização foi realizada com uma periodicidade de quatro em quatro dias. Foi igualmente avaliado o peso corporal de cada animal diariamente. Todos estes parâmetros foram registrados até ao dia do sacrifício.

### 2.2. Níveis plasmáticos de glicose

Os níveis plasmáticos de glicose foram monitorizados em todos os grupos, após jejum de 6 horas aos 0, 7 e 14 dias do procedimento para monitorização do tratamento com os

derivados da curcumina. Foram medidos no sangue da veia da cauda, com um glucómetro (Accu-Chek Aviva, Roche, EUA) e respetivas tiras de determinação.

### **2.3. Prova de tolerância à insulina**

No início e no final do período experimental, após um jejum de 6 horas, foi medida a glicemia na veia da cauda, e foi administrada a insulina (0,25U/mL) por via intraperitoneal, após a qual se procedeu a medições da glicemia aos 30, 60 e 120 minutos.

### **2.4. Níveis plasmáticos dos ácidos gordos livres**

Foram avaliados igualmente os níveis plasmáticos dos ácidos gordos livres com amostras de plasma recolhidas no dia do sacrifício, através do *Serum/Plasma Fatty Acid Kit* (Zenbio, Research Triangle Park, EUA). Todos os procedimentos foram efetuados de acordo com o indicado pelos fabricantes.

### **2.5. Colheita de sangue e recolha de tecidos**

Com dezasseis semanas de idade, após completarem um jejum de 4 horas, os ratos foram anestesiados uma solução 2:1 (v/v) de 50 mg/kg de solução de cetamina (100 mg/mL) e 2,5% de clorpromazina (5 mg/mL) administrada por injeção intraperitoneal e, de seguida, sacrificados por deslocamento cervical.

Antes do sacrifício, procedeu-se à recolha do sangue por punção cardíaca para isolamento de plasma, utilizando os tubos de colheita de sangue BD Vacutainer K3 EDTA (K3E) (Vacuette<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Alemanha), e de soro, usando os tubos BD Vacutainer Z Serum Sep Clot Activator (Vacuette<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Alemanha). O sangue foi centrifugado a 3500 rpm (2200  $\times$ g), durante 15 minutos a uma temperatura de 4°C, sendo posteriormente dividido em alíquotas armazenadas a -80°C.

Após o sacrifício recolheram-se os seguintes tecidos: tecido adiposo epididimal (TAE); rim; fígado; aorta. À exceção da aorta (elucidado na secção 6.1), todos estes tecidos foram pesados, lavados em tampão fosfato salino (*phosphate-buffered saline*, PBS), e imediatamente congelados em azoto líquido ou em gelo seco, sendo armazenados a -80°C.

### **3. Estudos *in vitro* – Estudos Funcionais**

#### **3.1. Isolamento e preparação da aorta**

Após o isolamento da aorta, esta foi colocada imediatamente numa solução fisiológica de *Krebs-Henseleit*, fria e arejada com carbogénio (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>), com a seguinte composição (em mmoles/L): NaCl 118,67; KCl 5,36; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,57; CaCl<sub>2</sub> 1,90; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,90; NaHCO<sub>3</sub> 25,0; glicose 11,1; pH 7,4.

De seguida, após eliminação do tecido conjuntivo adjacente, a aorta foi dividida em anéis com 3-4 mm de comprimento, para serem utilizadas imediatamente nos estudos funcionais. As restantes porções da aorta que não foram utilizadas para a realização dos estudos funcionais tiveram outras finalidades, nomeadamente inclusão em meio adequado para tecidos congelados, ou foram congeladas a -80°C para posterior lise e homogeneização.

#### **3.2. Reagentes e compostos utilizados**

Os reagentes usados na preparação da solução fisiológica de *Krebs-Henseleit* foram adquiridos na Panreac (Barcelona, Espanha) e foram produtos *pro analysis*. Para os estudos funcionais foram usados os seguintes reagentes: Noradrenalina, Cloridrato de Acetilcolina e Ácido Ascórbico da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e éter metílico de N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina (*NG-Nitro-L-arginine methylester*, L-NAME) da Tocris Bioscience (Bristol, GB), As soluções foram preparadas de acordo com as indicações providenciadas pelos fabricantes.

#### **3.3. Procedimento experimental**

Os anéis da aorta dissecados foram de seguida suspensos entre duas ansas de fio de platina, sob uma tensão basal ótima de 19,6 mN, e colocados em banhos de órgãos de 10 mL preenchidos com solução fisiológica *Krebs-Henseleit*, mantida a 37°C, ligados a transdutores de força isométrica (Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha) associados a um polígrafo (Polygraph 4006, Letica Scientific Instruments, Barcelona, Espanha) de quatro canais.

Após um período de equilíbrio de 2 horas, durante o qual os anéis da aorta foram lavados periodicamente, foi registado o relaxamento isométrico de duas curvas cumulativa concentração-resposta (CR) de acetilcolina (ACh, 0,01 a 90 μM) após pré-contração com 10 μM de noradrenalina (NA), na presença e na ausência de 100 μM de ácido ascórbico, adicionado ao banho 30 minutos antes da segunda curva CR. Em todas as experiências foram utilizados anéis controlo, aos quais não foi adicionado o ácido ascórbico.

De forma a confirmar o relaxamento NO-dependente induzido pela ACh, foi ainda realizada uma terceira curva, à qual foi adicionado éter metílico de N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina (*NG-Nitro-L-arginine methylester*, L-NAME), um inibidor da eNOS, adicionado ao banho de órgãos na concentração de 50 µM, 30 minutos antes da terceira curva CR.

Após cada curva, foi considerado um tempo de recuperação de 60 minutos, durante o qual os tecidos foram lavados com solução fisiológica de *Krebs-Henseleit*, até atingirem novamente o tónus basal inicial (Silva, Marques e Ribeiro, 2007).

As respostas de relaxamento à ACh, e nomeadamente a respetiva resposta máxima (Emáx), foram expressas em percentagem de inibição da resposta contráctil de cada anel à NA na primeira curva CR. A potência foi traduzida através do parâmetro pEC<sub>50</sub> (logaritmo negativo da concentração molar capaz de induzir metade da resposta máxima). Os valores de pEC<sub>50</sub> foram obtidos por interpolação de cada curva cumulativa CR em escala semi-logarítmica (% do relaxamento máximo versus logaritmo da concentração em mol/L), utilizando métodos computacionais (CurveExpert, versão 2.6.2 para Windows). Como cada anel funcionou como controlo de si próprio, na análise do efeito do ácido ascórbico a resposta à ACh na segunda curva foi calculada em percentagem do relaxamento máximo que foi obtido na primeira curva do mesmo anel. Em todas as experiências foram utilizados anéis controlo, aos quais não foi adicionado o ácido ascórbico, pelo que os resultados de cada ensaio foram expressos em percentagem da resposta obtida nos anéis de aorta que serviram como controlos.

## 4. Imunohistoquímica

Para determinação da nitrotirosina na aorta, foi utilizado o método de imunohistoquímica. As aortas previamente incluídas em meio adequado foram utilizadas para a realização de cortes histológicos de 7  $\mu\text{m}$  de espessura em lâminas silanizadas e posteriormente armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No dia a utilizar, as lâminas foram descongeladas à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.

As secções foram fixadas com acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de 3 lavagens com PBS. Em seguida, o tecido foi permeabilizado com uma solução de 0,25% de Triton-X-100 dissolvido em PBS, duas vezes por um período de 15 minutos, à temperatura ambiente.

Após a permeabilização, realizou-se uma lavagem com PBS, e procedeu-se ao bloqueio através da incubação com 1% de albumina bovina sérica (*Bovine Serum Albumin*, BSA) dissolvida em PBS (100  $\mu\text{L}$ /corte), durante 1 hora à temperatura ambiente, e posterior incubação com 2% de soro de cabra dissolvido em PBS com 1% de BSA durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-nitrotirosina (Millipore #06-284) diluído em PBS (1:200), à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  durante a noite. Findo esse período, procedeu-se à lavagem com PBS, à qual se seguiu a incubação com o anticorpo secundário contra coelho AlexaFluor488 (1:200), diluído em PBS, com adição de dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*, DAPI) (1:5000), durante uma hora ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após esse período, os tecidos foram lavados com PBS e preparados utilizando o meio de montagem *Glycergel*, para posterior leitura, a qual foi efetuada utilizando um microscópio confocal de fluorescência.

## 5. Análises bioquímicas – Western Blotting

### 5.1. Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados nesta metodologia foram comprados à Merck Darmstad (Alemanha) e Sigma-Aldrich (EUA). Todo o material de laboratório utilizado nesta técnica foi comprado à Bio-Rad (EUA) e Advansta (EUA). Os anticorpos primários utilizados encontram-se na tabela 1.

Anticorpo	Peso Molecular (KDa)	Diluição	Fabricante
Anti-IR	~ 90 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-IR ( <i>phospho Y1361</i> )	~ 90 KDa	1:1000	Abcam
Anti-GLUT4	54 KDa	1:1000	Abcam
Anti-PPAR $\gamma$	53, 57 KDa	1:1000	Cell Signaling
Anti-Sirt1	120 KDa	1:1000	Cell Signaling
Anti-eNOS	140 KDa	1:250	Transduction Laboratories
Anti-eNOS ( <i>pS1177</i> )	140 KDa	1:250	Transduction Laboratories
Anti-VEGF-A	~ 75 KDa	1:1000	Sicgen
Anti-CD31	83 KDa	1:1000	Sicgen
Anti-Nrf2	~ 100 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Nrf2 ( <i>phospho S40</i> )	~ 100 KDa	1:1000	Invitrogen
Anti-SOD1	~ 17/18 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SOD2	25 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Catalase	~ 60 KDa	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GLO1	~ 21 KDa	1:1000	Abcam
Anti-MG-H1	~ 70 KDa	1:50	Hycult Biotech
Anti-RAGE	~ 25, 45 KDa	1:1000	Abcam
Calnexina	83 KDa	1:000	Sicgen

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados em Western Blotting.

## 5.2. Preparação das amostras

A técnica iniciou-se com a homogeneização mecânica de 100 mg dos tecidos, de cada animal dos diferentes grupos experimentais, em 1 mL de tampão de homogeneização (tabela 2). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 14000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C, tendo sido recolhida a fração sobrenadante, com posterior centrifugação nas mesmas condições durante 10 minutos. Recolheu-se novamente o sobrenadante, o qual foi dividido em alíquotas, algumas das quais foram armazenadas a -80°C. Às alíquotas a utilizar no momento, foi adicionado o tampão de desnaturação (*Sample Buffer 2x*, tabela 2) numa proporção de 1:1. Estas amostras foram em seguida sonicadas durante 10 segundos a um pulso de 8 KHz e fervidas a aproximadamente 100°C durante 5 minutos.

## 5.3. Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida

Para a realização da eletroforese, usando as soluções *Resolving* e *Stacking* (tabela 2), foram polimerizados géis, que variavam na percentagem de acrilamida entre 8% a 12%, dependendo do peso molecular da proteína pretendida, com 10 poços e 1 ou 1,5 mm de espessura.

O sistema de eletroforese foi preenchido por tampão de corrida (*Running Buffer*, tabela 2). Nos géis, foi adicionado o marcador de peso molecular *GRS Protein Marker MultiColour* (Grisp, Portugal) num poço, de forma a permitir distinguir as proteínas consoante o seu peso molecular no gel, e nos restantes poços foram carregadas 30 µg de cada amostra. A eletroforese foi realizada a 80 V por 15 minutos e a 120 V até ao marcador atingir o nível pretendido.

## 5.4. Transferência do Gel para a Membrana de PVDF

Após a eletroforese, procedeu-se à transferência das proteínas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Advansta, EUA).

Inicialmente as membranas de PVDF foram ativadas com metanol, durante aproximadamente 10 segundos, ao qual se seguiu a hidratação em água ultrapura, durante aproximadamente 1 minuto e, por fim, foram colocadas em tampão de transferência (*Transfer Buffer*, tabela 2). Este processo permite que a membrana se torne hidrofílica, possibilitando a transferência das proteínas presentes no gel. De seguida, foi montado o sistema de transferência, *Transfer Blot* (Biotad, EUA), no qual cada gel foi colocado em contacto com a

respetiva membrana, com uma passagem de corrente direcionada do gel para a membrana, com amperagem constante (750 mA), durante 1:30h.

Findo o processo de transferência e de modo a permitir um aumento da especificidade de ligação dos anticorpos, as membranas foram colocadas numa solução de bloqueio, constituída por solução tampão de Tris (*Tris Buffer Solution*, TBS) (tabela 2), Tween 0,01% e BSA a 5% (TBS-T 0,01% + 5% BSA) (tabela 2), durante um período de 2 horas.

### **5.5. Incubação e marcação com Anticorpos**

Após o bloqueio das membranas, estas foram incubadas com os anticorpos primários, anteriormente referidos (tabela 1), durante um período de 2 horas à temperatura ambiente ou durante a noite (*overnight*) a 4°C, consoante indicações do fabricante. Findo esse período, as membranas foram colocadas na solução de lavagem, TBS com Tween a 0,05% (TBS-T 0,05%, tabela 2), durante 1h.

Após a lavagem, as membranas foram incubadas com os respetivos anticorpos secundários (anti-ratinho e anti-cabra, BioRad, EUA; anti-coelho, GE Healthcare, GB), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Findo esse período de 2 horas, as membranas foram novamente lavadas com solução TBS-T a 0,05%, durante 1 hora.

### **5.6. Revelação das membranas**

Para finalizar a técnica, as membranas foram reveladas com o substrato *Enhanced Chemiluminescence* (ECL), utilizando o *Western Blotting detection kit* (Advansta, EUA) numa proporção 1:1. A adição deste substrato à membrana, permite a revelação através do sistema de deteção de luminescência *VersaDoc* (BioRad, EUA), com recurso ao programa informático *Quantity One* (BioRad, EUA). Para quantificação da quantidade de proteína recorreu-se ao *software Image Quant*<sup>®</sup> 5.0 (Molecular Dynamics, EUA).

<b>Tampão de homogeneização, pH=7,4</b>	<b>Tampão de desnaturação (2x), pH=6,8</b>
0,25M Tris-HCl; 125 mM NaCl; 1% Triton-X-100; 0,5% SDS; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 20mM NaF; 2mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 10mM β-glicerofosfato; 2,5 mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF; 40μL de cocktail inibidor de proteases/g de tecido.	62,5mM Tris-HCl; 10% Glicerol; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 0,01% Azul bromofenol.
<b>Solução Resolving (2x), pH=8,8</b>	<b>Solução Stacking (2x), pH=6,8</b>
0,75M Tris-HCl; 0,2% SDS.	0,25M Tris-HCl; 0,2% SDS.
<b>Tampão de corrida, pH=8,8</b>	<b>Tampão de transferência, pH=11</b>
125mM Tris-HCl; 480mM Glicina; 1% SDS.	100mM CAPS; 2% NaOH; 10% Metanol.
<b>Solução TBS-T e BSA, pH=7,6</b>	<b>Solução de lavagem, pH=7,6</b>
25 mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,01% de Tween20.	25mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween20.

**Tabela 3 - Constituição das soluções utilizadas em Western Blotting.**

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; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 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, albumina bovina sérica.

## **6. Análise estatística**

### **6.1. Análise estatística dos resultados do estudo *in vivo* e da análise bioquímica**

Para a realização da análise estatística procedeu-se à determinação das diferenças estatísticas entre os 6 grupos em estudo *in vivo*, no qual foi usado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para amostras independentes, uma vez que o número de amostras por grupo é reduzido, inferior à distribuição normal (curva de Gauss). Os valores de  $p$  inferiores a 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados indicativos de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados estão expressos em valores médios  $\pm$  erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.). Na análise estatística foram utilizados o GraphPad Prism PC Software e o IBM SPSS Statistics Software.

### **6.2. Análise estatística dos resultados dos estudos funcionais**

Para a determinação das diferenças estatísticas entre os 6 grupos dos estudos *in vivo* dos valores de  $pEC_{50}$  e  $Emax$  da ACh, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, com amostras independentes, e o teste  $t$  de Student para dados não emparelhados, para comparar a resposta contrátil de aorta isolada dos animais dos 6 grupos à ACh, na presença e na ausência de ácido ascórbico.

Os valores de  $p$  inferiores a 0,05 ( $P < 0,05$ ) foram considerados indicativos de diferenças estatisticamente significativas. Todos os resultados estão expressos em valores médios  $\pm$  erro padrão da média (*Standard Error of the Mean*, S.E.M.) do número de anéis de aorta por animal indicado. Na análise estatística foram utilizados o GraphPad Prism PC Software e o IBM SPSS Statistics Software.

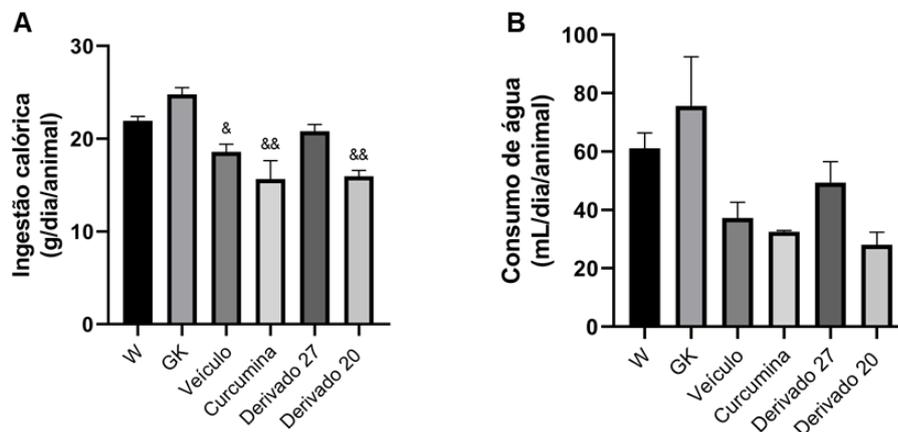
# **Capítulo V**

## **Resultados**

## I. Monitorização da ingestão calórica e do peso

Durante as duas semanas de tratamento, foi monitorizada a ingestão calórica (figura 4A) e o consumo de água (figura 4B) de 4 em 4 dias. Observou-se uma diminuição significativa da ingestão calórica (g/dia/animal) nos animais submetidos a DMSO, curcumina e Derivado 20 (figura 4A), em comparação com o grupo GK. Contudo o mesmo não se verificou com os animais tratados com o Derivado 27, visto que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

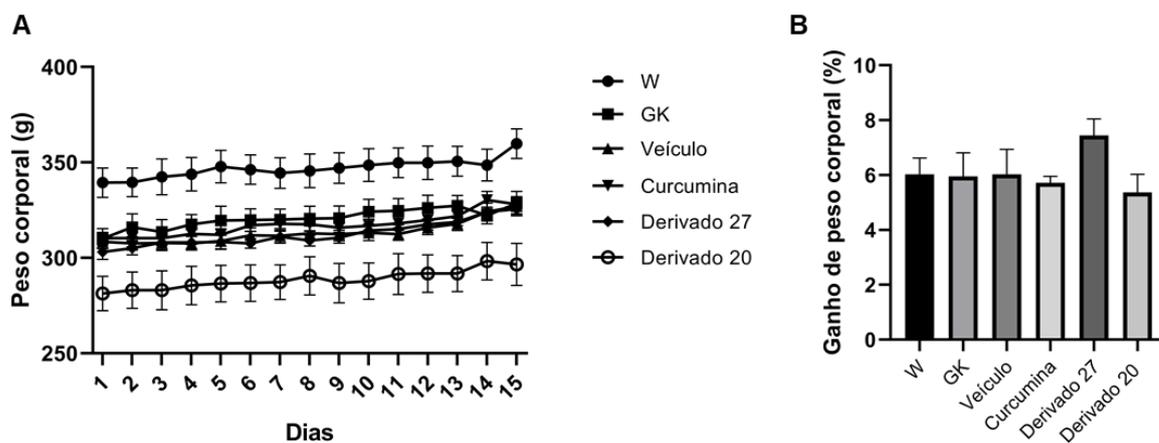
Relativamente ao consumo de água, os animais dos diferentes grupos não apresentaram diferenças significativas entre si (figura 4B). No entanto, verificou-se que este parâmetro está sujeito a uma elevada variabilidade, o que pode resultar do baixo número de animais por grupo.



**Figura 4 - Avaliação da ingestão calórica (A) e do consumo de água (B) dos diferentes grupos experimentais.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. &  $p < 0,05$ , vs. GK; &&  $p < 0,01$ , vs. GK.

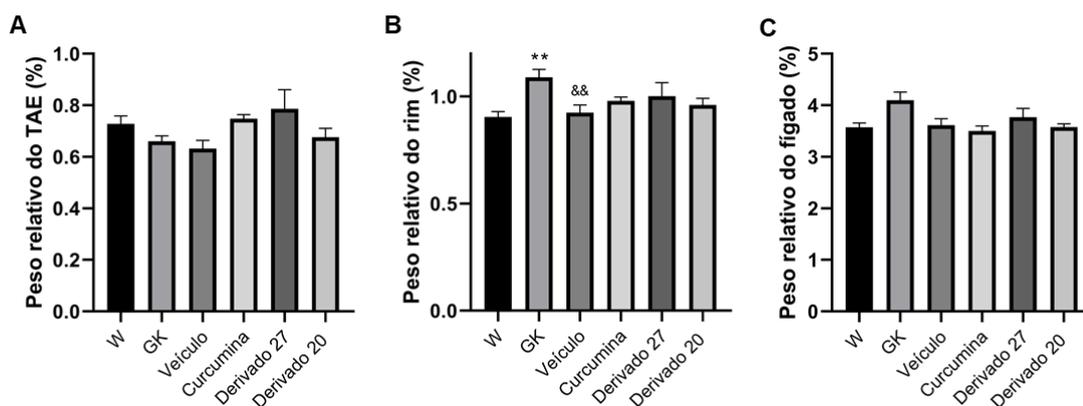
No que diz respeito ao peso corporal, os animais dos diferentes grupos de estudo não apresentaram diferenças significativas. Contudo foi visível uma tendência para um aumento de peso no grupo de animais tratados com o Derivado 27 (figura 5B).



**Figura 5 - Evolução do peso corporal ao longo dos 15 dias do estudo (A) e percentagem de ganho de peso (B) dos diferentes grupos experimentais.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M..

Em relação ao peso dos tecidos, foram registados os pesos do TAE, rim e fígado, e foi calculada a percentagem em relação ao peso corporal. Os pesos relativos do TAE (figura 6A) e do fígado (figura 6C) não apresentaram diferenças significativas, contudo, no que diz respeito ao peso do rim, verificou-se um aumento no grupo GK em relação ao grupo W e uma diminuição no grupo Veículo em relação ao grupo GK (figura 6B).



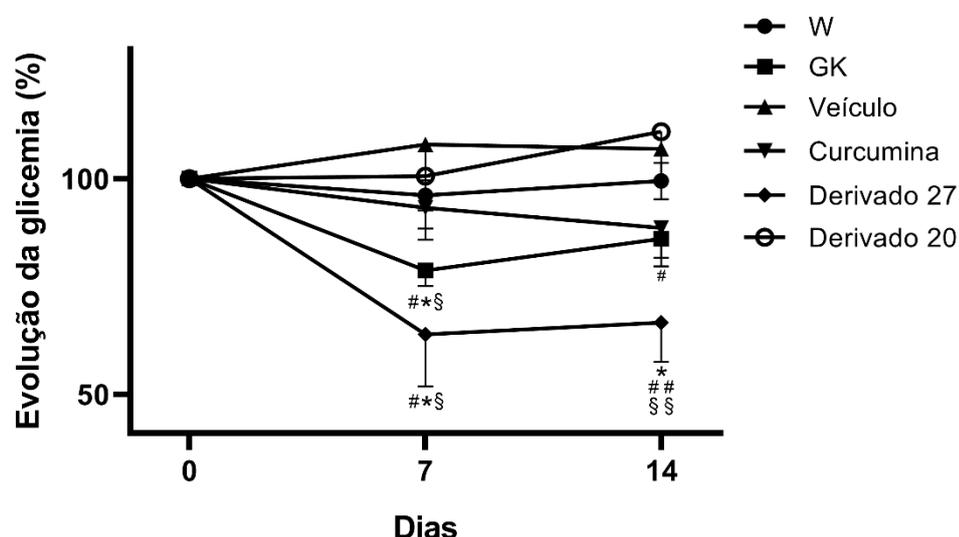
**Figura 6 - Avaliação do peso do TAE (A), do rim (B) e do fígado (C) expressos em percentagem do peso corporal.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. &&  $p < 0,01$ , vs. GK; \*\*  $p < 0,01$  vs. W.

## 2. Glicemia e Sensibilidade à Insulina

### 2.1. Níveis plasmáticos de glicose e teste de tolerância à insulina

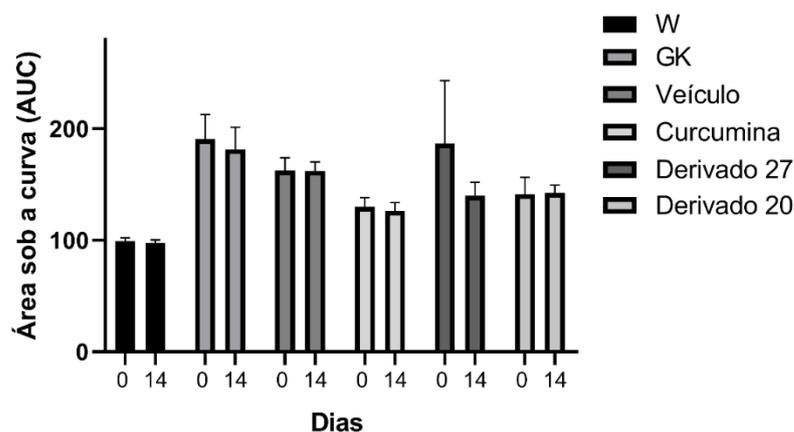
Os níveis plasmáticos de glicose, durante os 14 dias de tratamento, sofreram uma diminuição estatisticamente significativa no grupo GK e, mais acentuada, no grupo tratado com o Derivado 27 (figura 7). A glicemia do grupo GK, aos 7 dias de tratamento, diminuiu, em percentagem, em relação aos grupos W, Veículo e Derivado 20. Aos 14 dias, no grupo GK observou-se um aumento da glicemia, mantendo a diferença apenas em relação ao grupo Veículo. Relativamente ao Derivado 27, aos 7 dias de tratamento, a glicemia foi significativamente inferior à dos grupos W, Veículo e Derivado 20. O mesmo se verificou aos 14 dias de tratamento, com um grau de significância maior relativamente aos grupos Veículo e Derivado 20.



**Figura 7 - Avaliação da glicemia ao longo do estudo, com medições nos dias 0, 7 e 14.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. \*  $p < 0.05$ , vs. W; #  $p < 0.05$ , vs. Veículo; ##  $p < 0.01$  vs. Veículo; \$  $p < 0.05$ , vs. Curcumina; \$\$  $p < 0.01$ , vs. Curcumina; §  $p < 0.05$ , vs. Derivado 20; §§  $p < 0.01$ , vs. Derivado 20.

No que diz respeito à AUC calculada a partir do TTI (figura 8), que permite avaliar a resistência à insulina, não se observaram diferenças significativas nos animais do mesmo grupo ao longo do tratamento.

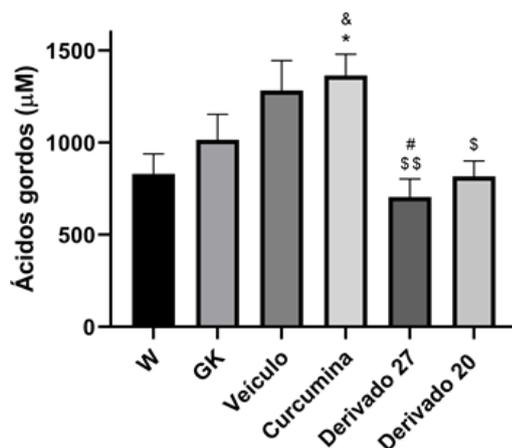


**Figura 8 - Avaliação da AUC calculada a partir do TTI realizado nos dias 0 e 14.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M.

## 2.2. Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres

Os níveis plasmáticos de FFA (figura 9), apresentaram um aumento no grupo tratado com curcumina, em relação aos grupos W e GK. Em comparação com a curcumina, observou-se uma diminuição nos grupos Derivado 27 e Derivado 20. Para além disso, verificou-se uma diminuição no grupo tratado com o Derivado 27 em comparação com o grupo Veículo.

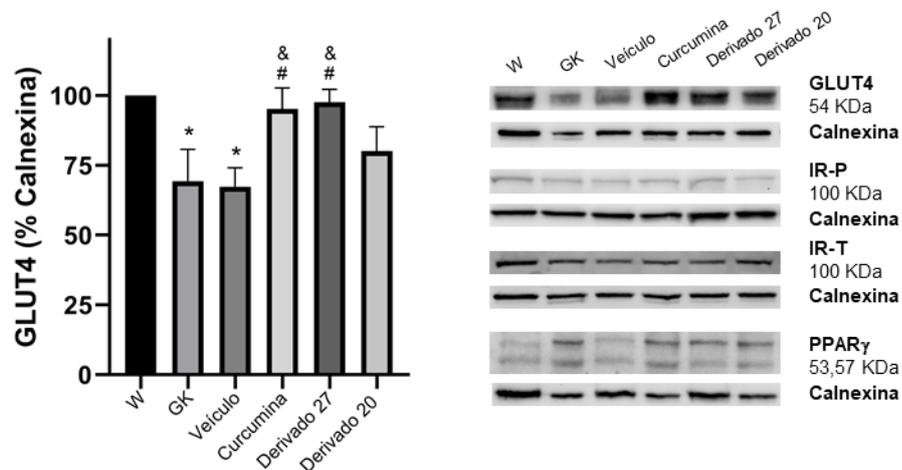


**Figura 9 - Avaliação dos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. \*  $p < 0.05$  vs. W; & vs. GK; #  $p < 0.05$  vs. Veículo; \$  $p < 0.05$  vs. Curcumina; \$\$  $p < 0.01$  vs. Curcumina.

### 2.3. Análise dos marcadores envolvidos no metabolismo da glicose no tecido adiposo epididimal

De forma a elucidar os mecanismos moleculares subjacentes à melhoria da homeostase da glicose e dos lípidos, procedeu-se à determinação dos níveis proteicos de GLUT-4, PPAR $\gamma$  e da forma total e fosforilada do IR no tecido adiposo epididimal, por Western Blotting (figura 10). De entre as proteínas analisadas, observou-se uma diminuição dos níveis de GLUT-4 nos grupos GK e veículo, em comparação com o grupo W. Verificou-se, igualmente, um aumento significativo do GLUT-4 nos grupos tratados com curcumina e com o Derivado 27, em relação aos grupos veículo e GK. As restantes proteínas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados.



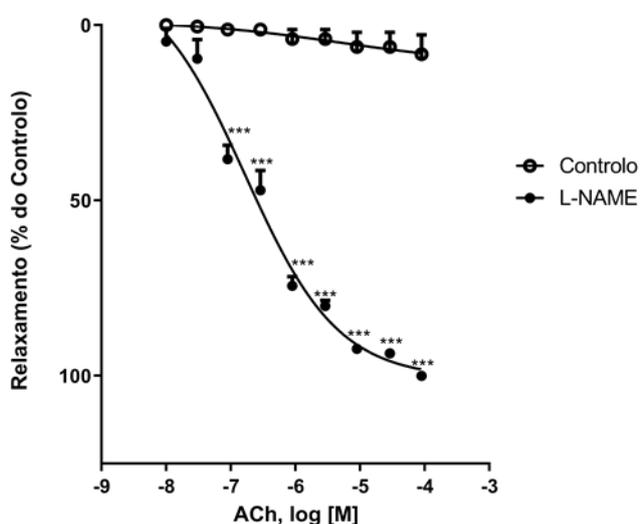
**Figura 10 - Avaliação dos níveis de GLUT4 no tecido adiposo epididimal.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, e estão traduzidos em função da calnexina, utilizada como padrão interno. As barras verticais representam o S.E.M.. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. \*  $p < 0.05$  vs. W; &  $p < 0.05$  vs. GK; #  $p < 0.05$  vs. Veículo.

### 3. Avaliação da função vascular

#### 3.1. Resposta vasorrelaxante da aorta isolada

Com o objetivo de avaliar a resposta de relaxamento da aorta isolada dos animais dos diferentes grupos, realizaram-se estudos funcionais com a execução de curvas concentração-resposta à ACh, na ausência e na presença do antioxidante ácido ascórbico (figura 12 e 13). Na tabela 4 estão representados os valores do  $Emáx$  e os valores de  $pEC_{50}$  que representam, respetivamente, eficácia e potência. Para confirmar o relaxamento NO-dependente induzido pela ACh, foram executadas curvas CR na presença de L-NAME que aboliu praticamente o vasorrelaxamento nos seis grupos de animais. A figura 11 mostra uma imagem representativa da abolição do relaxamento pelo L-NAME, neste caso de um animal do grupo Veículo.



**Figura 11 – Relaxamento induzido pela ACh na ausência (Controlo) e na presença de L-NAME em anéis de aorta isolada dos animais do grupo Veículo.**

Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste *t* de Student, de dados não emparelhados; \*\*\*  $p < 0.01$  vs. Controlo.

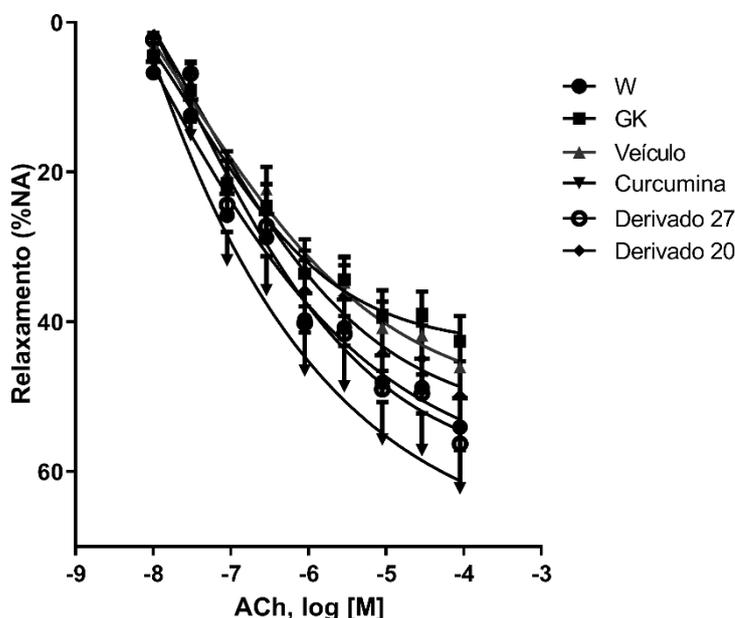
Relativamente ao  $Emáx$  (tabela 4), o grupo Curcumina foi o que apresentou um maior relaxamento induzido pela ACh ( $62,2 \pm 5,09\%$ ) e significativamente diferente do valor dos grupos GK e Veículo ( $44,16 \pm 3,11$  e  $46,02 \pm 3,48$ , respetivamente). Para além disso, observou-se um aumento significativo do  $Emáx$  do grupo tratado com Derivado 27 ( $56,25 \pm 2,46$ ) em comparação com o grupo GK ( $44,16 \pm 3,11$ ).

Quanto ao  $pEC_{50}$ , não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos (tabela 4).

	$E_{max}$ (%)	pEC <sub>50</sub>	a/n
W	51,15 ± 4,52	-6,57 ± 0,18	14/5
GK	44,16 ± 3,11	-6,85 ± 0,10	17/9
Veículo	46,02 ± 3,48	-6,55 ± 0,14	11/4
Curcumina	62,22 ± 5,09 <sup>&amp;&amp;#</sup>	-6,77 ± 0,12	12/4
Derivado 27	56,25 ± 2,46 <sup>&amp;</sup>	-6,61 ± 0,08	11/4
Derivado 20	49,80 ± 4,53	-6,59 ± 0,09	10/4

**Tabela 4 - Valores de  $E_{max}$  e pEC<sub>50</sub> para a ACh em aorta isolada dos diferentes grupos experimentais.**

$E_{max}$  = relaxamento máximo em percentagem de inibição da contração induzida pela noradrenalina (NA); pEC<sub>50</sub> = logaritmo negativo da concentração molar de ACh necessária para induzir 50% da resposta máxima. A coluna a/n representa o quociente entre o número de anéis de aorta e o número de ratos a partir dos quais se disseccionaram os anéis. W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. & p<0.05 vs. GK; && p<0.01 vs. GK; # p<0.05 vs. Veículo.



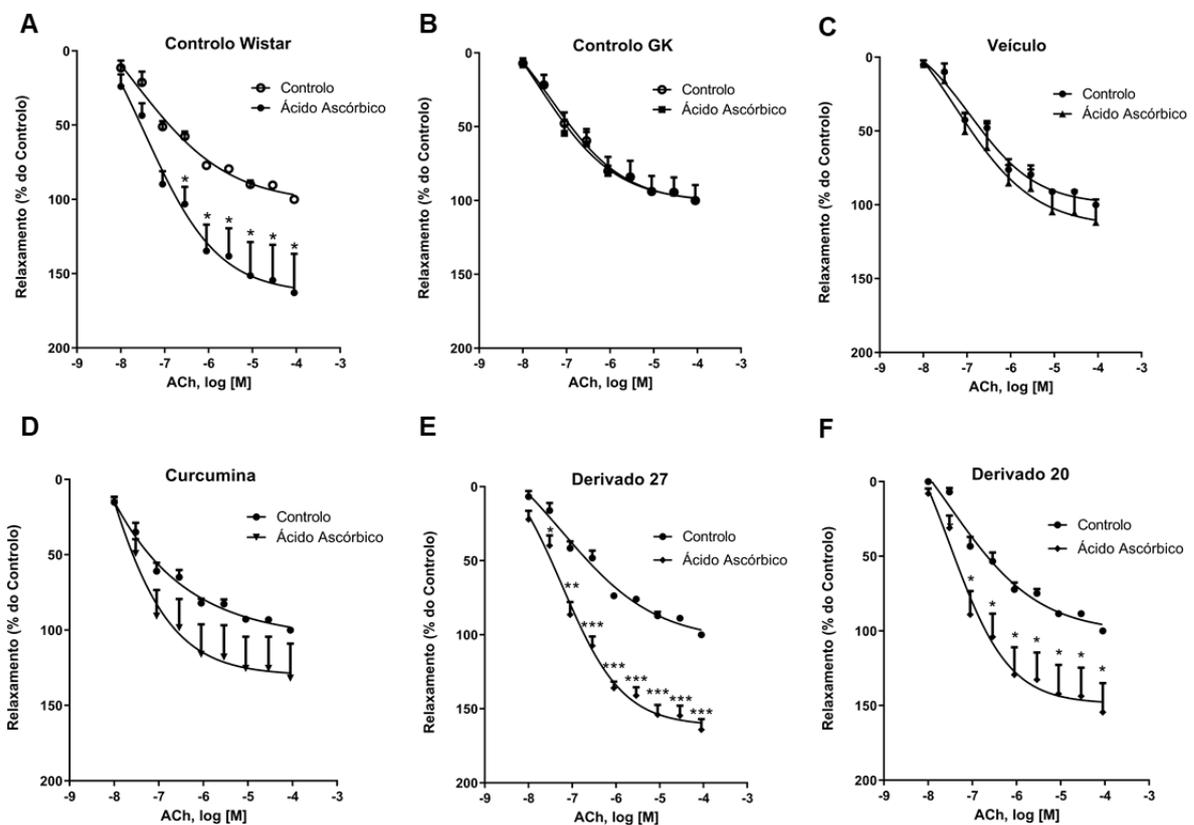
**Figura 12 - Relaxamento induzido pela ACh (em % de inibição da contração induzida pela NA) em anéis de aorta isolada dos animais dos diferentes grupos experimentais.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média ± S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M..

### 3.2. Efeito do ácido ascórbico na resposta vasorrelaxante da aorta isolada

Para avaliar a influência dos ROS na resposta vasorrelaxante à ACh das aortas isoladas dos 6 grupos de estudo, realizou-se uma segunda curva concentração-resposta na presença de ácido ascórbico, um antioxidante, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

A incubação com ácido ascórbico não alterou a resposta vasorrelaxante nos grupos GK (figura 13B), Veículo (figura 13C) e Curcumina (figura 13D), apesar de ser visível uma tendência para o aumento do relaxamento nos animais tratados com curcumina. No entanto, no que diz respeito aos grupos W (figura 13A), Derivado 27 (figura 13E) e Derivado 20 (figura 13F), observou-se um aumento significativo do relaxamento, sendo mais acentuado no grupo tratado com o Derivado 27. Isto é, o tratamento com os derivados da curcumina repôs a situação controle, porém de forma ainda mais significativa no grupo Derivado 27.



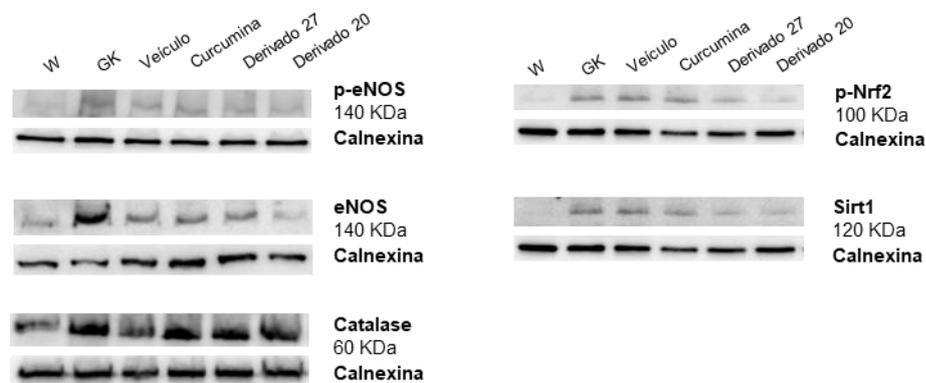
**Figura 13 - Relaxamento induzido pela ACh na ausência (Controlo) e na presença de ácido ascórbico em anéis de aorta isolada dos animais dos grupos W (A), GK (B); Veículo (C); Curcumina (D); Derivado 27 (E); Derivado 20 (F).**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, sendo que as barras verticais representam o S.E.M. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste t de Student, de dados não emparelhados; \*  $p < 0.05$  vs. Controlo; \*\*  $p < 0.01$  vs. Controlo; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Controlo.

### 3.3. Análise dos marcadores da função endotelial por Western Blotting

Com o intuito de estudar o efeito do tratamento com os derivados da curcumina nas vias de sinalização envolvidas no vasorrelaxamento e no stress oxidativo, foram realizados estudos moleculares em homogeneizados dos tecidos alvo, aorta (figura 14), TAE (figura 15), rim (figura 16A) e fígado (figura 16B), recorrendo à técnica de Western Blotting.

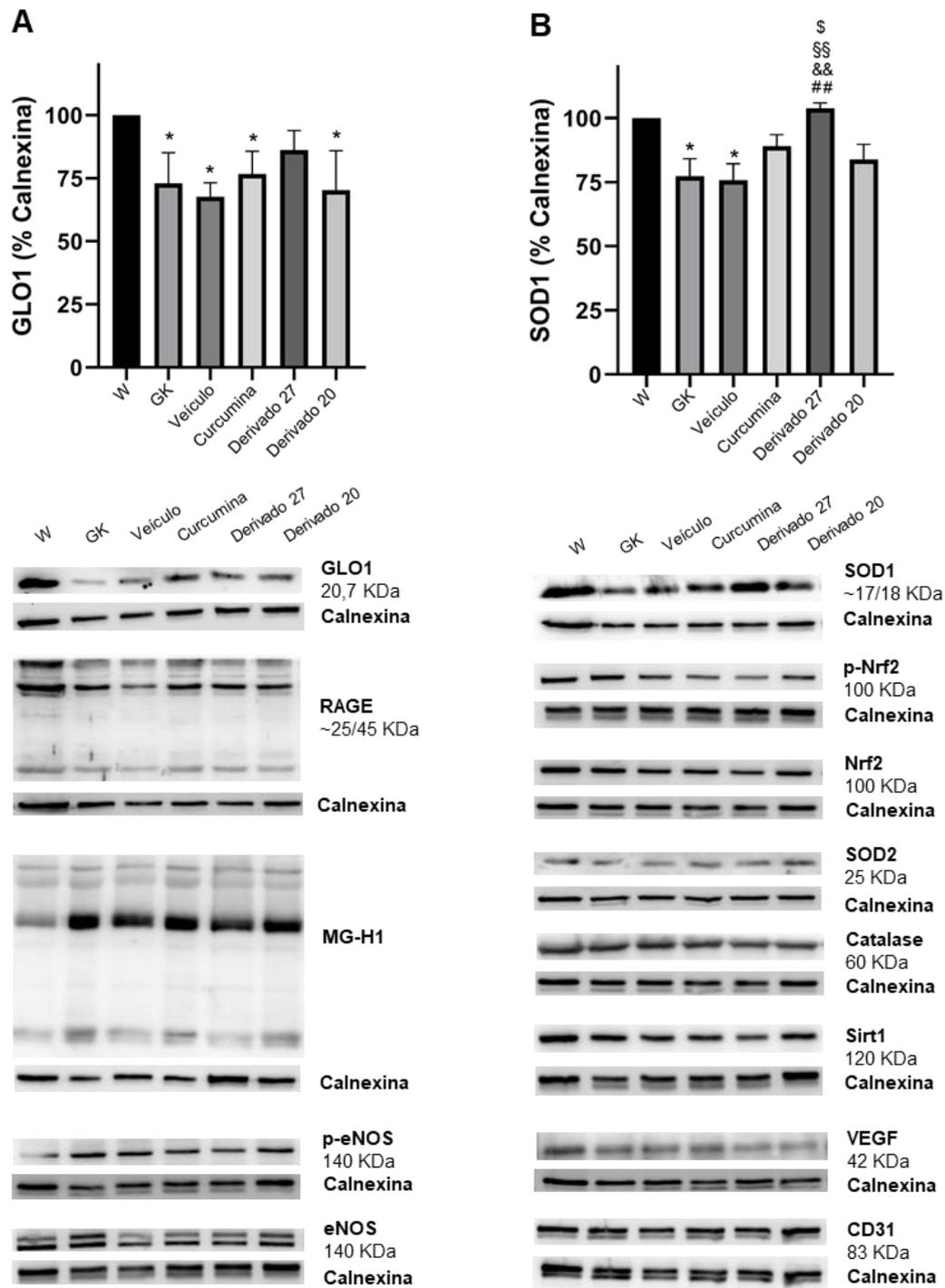
Relativamente à aorta, foram avaliados os níveis da Sirt1, da forma fosforilada do Nrf2, da catalase, e das formas total e fosforilada da eNOS (figura 14). Os resultados obtidos não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em estudo.



**Figura 14 - Avaliação dos níveis da Sirt1, da forma fosforilada do Nrf2, da Catalase, e das formas total e fosforilada da eNOS na aorta por Western Blotting.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados em função da calnexina, utilizada como padrão interno.

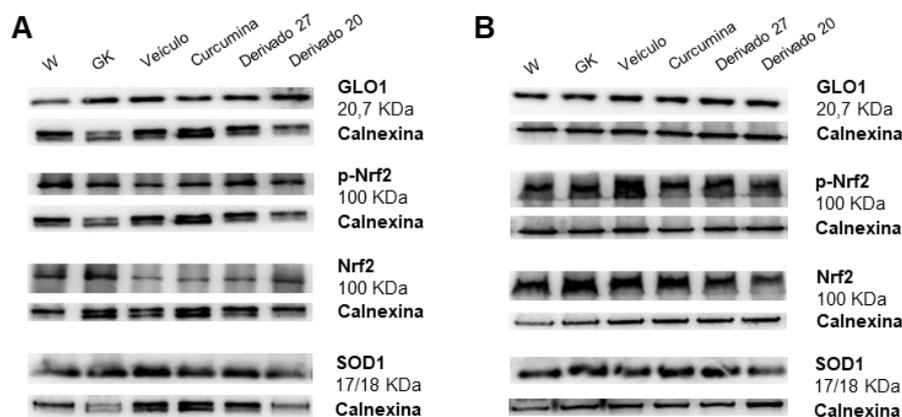
No que diz respeito ao tecido adiposo epididimal, foram analisados os níveis das seguintes proteínas: GLO1; RAGE; MG-H1; Sirt1; forma total e fosforilada do Nrf2; SOD1; SOD2; Catalase; VEGF; CD31; forma total e fosforilada da eNOS. A GLO1 apresentou uma diminuição nos animais dos grupos GK, Veículo, Curcumina e Derivado 20, quando comparados com o grupo W (figura 15A). No grupo tratado com o Derivado 27 verificou-se uma normalização dos níveis de GLO1, deixando de se verificar a diferença para o grupo controlo. Relativamente ao nível da SOD1 no tecido adiposo epididimal (figura 15B), observou-se uma diminuição significativa nos grupos GK e Veículo em relação ao grupo Wistar, e um aumento significativo nos animais tratados com Derivado 27, em relação aos grupos GK, Veículo, Curcumina e Derivado 20.



**Figura 15 - Avaliação dos níveis de GLO1 (A) e SOD1 (B) no tecido adiposo epididimal por Western Blotting, bem como imagens representativas de outros marcadores de stress oxidativo, glicação e função vascular do tecido adiposo.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  S.E.M. de 4 a 9 animais por grupo, e estão traduzidos em função da calnexina, utilizada como padrão interno. As barras verticais representam o S.E.M.. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, com amostras independentes. \*  $p < 0.05$  vs. W; §  $p < 0.05$  vs. Curcumina; &&  $p < 0.01$  vs. GK; ##  $p < 0.01$  vs. Veículo. §§  $p < 0.01$  vs. Derivado 20.

Foram ainda sujeitos a análise por Western Blotting o rim (figura 16A) e o fígado (figura 16B), nos quais não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nos níveis da GLO1, SOD1 e forma total e fosforilada do Nrf2.



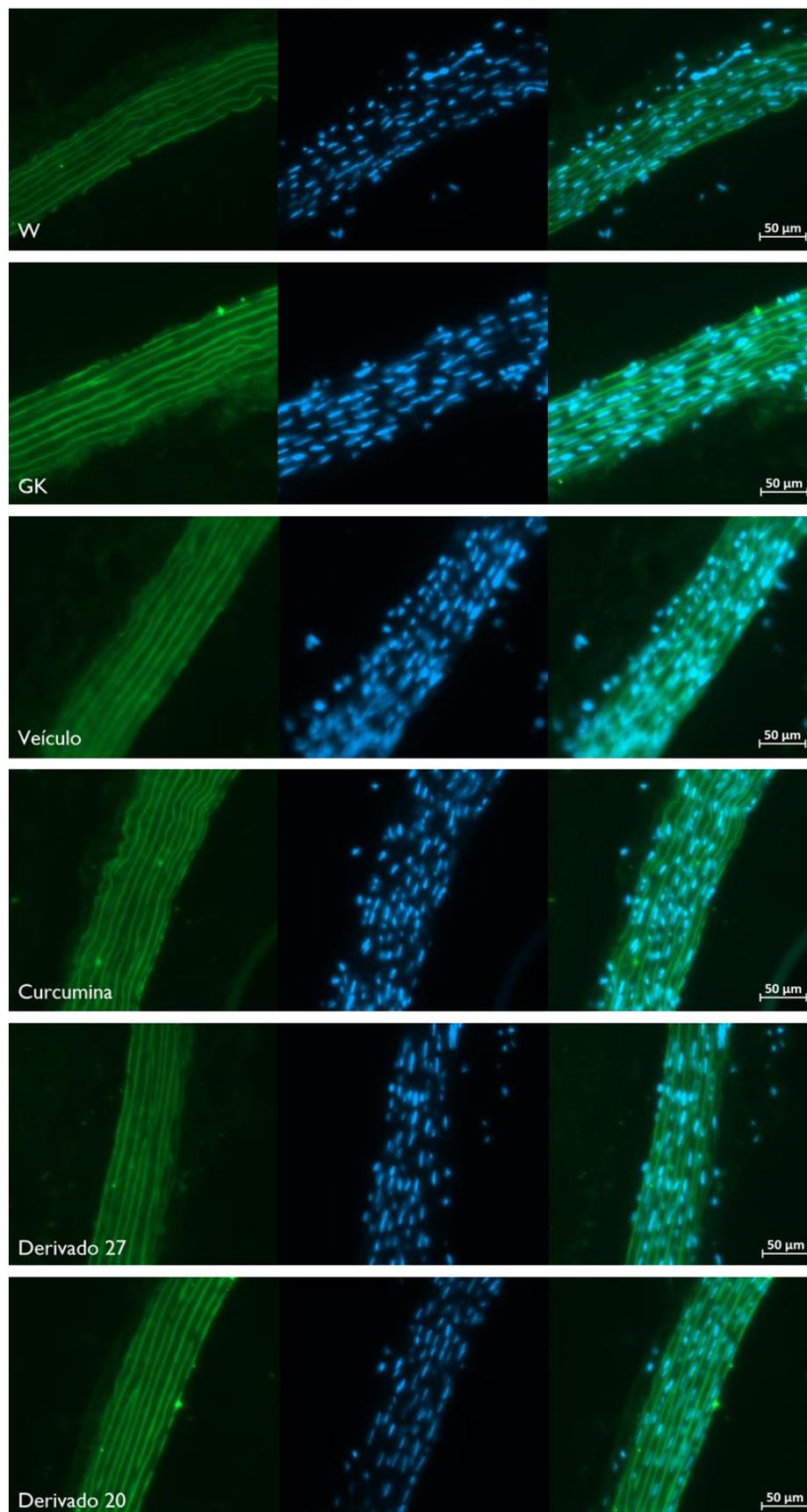
**Figura 16 - Determinação dos níveis de GLO1, p-Nrf2, Nrf2 e SOD1 no rim (A) e no fígado (B) por Western Blotting.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia). Os resultados estão apresentados em função da calnexina, utilizada como padrão interno.

### 3.4. Imunohistoquímica

#### 3.4.1. Nitrotirosina

Para deteção da nitrotirosina na aorta isolada, foi utilizado o método de imunohistoquímica (figura 17). Tendo em conta que foi analisada apenas uma amostra de cada grupo, os resultados preliminares parecem sugerir que existe uma diminuição da imunomarcção para a nitrotirosina nos animais tratados com Derivado 27.



**Figura 17 – Marcação da nitrotirosina em cortes histológicos da aorta dos animais dos diferentes grupos em estudo.**

W - Controlo Wistar; GK - Controlo Goto-Kakizaki; Veículo - Goto-Kakizaki submetido à administração de veículo (DMSO); Curcumina - Goto-Kakizaki submetido à administração de curcumina (40 mg/Kg/dia); Derivado 27 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 27 (52.4 mg/Kg/dia); Derivado 20 - Goto-Kakizaki submetido à administração de Derivado 20 (40 mg/Kg/dia).

# **Capítulo VI**

## **Discussão**

## Discussão

Este trabalho visou o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica para as complicações vasculares da diabetes através da modificação da curcumina. A T2DM é uma doença metabólica crônica, com mortalidade e morbidade associada devido às suas complicações (Zheng, Ley e Hu, 2017). Embora seja uma doença heterogênea, caracteriza-se por um aumento dos níveis sanguíneos de glicose, devido ao aumento da resistência à insulina e à disfunção das células  $\beta$  pancreáticas (DeFronzo *et al.*, 2015). A hiperglicemia contribui para o desenvolvimento progressivo de complicações devido, entre outros fatores, ao aumento do stress oxidativo (Rolo e Palmeira, 2006). De entre as complicações da T2DM, as cardiovasculares são as que se associam a maior morbidade e mortalidade (Zheng, Ley e Hu, 2017). Efetivamente a função macrovascular encontra-se afetada na diabetes, na medida em que se verifica um processo de disfunção endotelial, que pode levar ao desenvolvimento da aterosclerose e, mais tarde, a acidentes isquémicos (Brownlee, 2001).

A terapêutica atual para a T2DM tem como foco principal o controlo intensivo da homeostase da glicose, mas esta estratégia permite apenas uma prevenção inespecífica e parcialmente ineficaz contra a progressão das complicações associadas à diabetes. Assim, estratégias que visem a redução do stress oxidativo e nitrosativo podem oferecer uma nova abordagem para atenuar as complicações da T2DM. O uso de produtos naturais tem sido alvo de uma forte aposta da investigação no tratamento da DM. A curcumina, em particular, é o principal polifenol encontrado no rizoma da *Curcuma Longa*, e possui diversas propriedades tais como antibacterianas, anti-inflamatórias, hipoglicémicas, antioxidantes e cicatrizantes, antivirais, anticoagulantes, entre outras (Chattopadhyay *et al.*, 2004; Ghosh, Banerjee e Sil, 2015; Rivera-Mancía, Lozada-García e Pedraza-Chaverri, 2015). Este potencial decorre da capacidade da molécula em modular diversas vias de sinalização, o que proporciona ao polifenol potencial para o tratamento de diversas condições, nas quais se inclui a DM (Gupta, Patchva e Aggarwal, 2013). Apesar da forte atividade intrínseca da curcumina, a baixa biodisponibilidade, é a maior limitação ao seu uso clínico (Anand *et al.*, 2007; Prasad, Tyagi e Aggarwal, 2014). Como tal, de forma a melhorar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, são várias as estratégias que têm sido desenvolvidas e testadas. No entanto, as abordagens da química medicinal têm apresentado limitações no que diz respeito à potência, à eficácia e/ou à biodisponibilidade (Tomeh, Hadianamrei e Zhao, 2019). Tendo em conta este contexto, neste projeto foram estudados dois novos derivados da Curcumina, o Derivado 20 e o Derivado 27, desenvolvidos com o objetivo de potenciar os efeitos do polifenol.

A estrutura da curcumina é caracterizada por dois anéis aromáticos com grupos metóxi e grupos fenólicos, ligados por uma cadeia de sete carbonos que corresponde à cadeia  $\beta$ -dicetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. A reatividade da curcumina é determinada por esses três grupos reativos, os quais têm três protões lábeis sujeitos ao equilíbrio protónico. A capacidade desses grupos atuarem como neutralizadores das ROS, depende da natureza das mesmas (Singh *et al.*, 2011). Em ambos os derivados sintetizados, foram alteradas as posições dos grupos hidroxilo e do grupo metóxi no anel aromático, sendo que o grupo hidroxilo passou para a posição meta e o grupo metóxi para a posição para, em relação à cadeia  $\beta$ -dicetona da molécula. A alteração da posição do grupo fenólico para uma posição mais próxima da cadeia dicetona, pode conferir ao grupo -OH uma maior energia de dissociação, tornando-o menos suscetível à doação do hidrogénio, o que, a nível biológico, confere à molécula uma menor capacidade antioxidante para as espécies reativas cuja neutralização é mediada diretamente pelo grupo fenólico, como, por exemplo, o radical peróxido. Por outro lado, existem ROS, nos quais se incluem o peróxido e o oxigénio singlete, cuja neutralização ocorre por reação com a cadeia dicetona, por intermédio dos grupos vinílicos da porção ceto-enol, formando radicais pro-oxidantes, que são convertidos e estabilizados a radicais menos reativos pelo grupo fenólico. No Derivado 27, foi introduzido um grupo terbutóxido na posição central da cadeia dicetona, alterando o ratio ceto/enol, o que sugere que este derivado tem mais predisposição a sofrer interconversão tautomérica. Como tal, esta alteração torna os grupos vinílicos da cadeia dicetona mais suscetíveis para reagir com as ROS.

Tendo por base este enquadramento, recorreu-se a um modelo animal de T2DM, o rato GK, com o objetivo de avaliar os efeitos dos novos derivados da curcumina, quer a nível metabólico, através do perfil glicémico e lipídico e da sensibilidade à insulina, quer a nível das complicações vasculares, estudando-se órgãos alvo das complicações microvasculares (rim e tecido adiposo) e macrovasculares (aorta). Foram realizados ensaios funcionais em aorta isolada, nos quais foi avaliada a resposta de relaxamento NO-dependente induzida pela ACh.

Neste estudo os parâmetros ingestão calórica, consumo de água e peso corporal foram monitorizados de forma a avaliar o bem-estar animal. Não se observaram diferenças significativas relativamente ao consumo de água, contudo verificou-se que este parâmetro está sujeito a uma elevada variabilidade, o que pode resultar do número reduzido de animais por grupo. Relativamente ao peso corporal, os animais dos diferentes grupos de estudo não apresentaram diferenças significativas. Já no que diz respeito à ingestão calórica, observou-se uma diminuição significativa nos grupos Veículo, Curcumina e Derivado 20 em relação ao

grupo GK. Esta diminuição pode estar associada ao DMSO utilizado como veículo e/ou ao stress induzido pela injeção diária subcutânea.

A dose máxima usualmente considerada e recomendada de DMSO para a via de administração intravenosa é de 0,1 mL/kg na percentagem de 100% (v/v) (Neervannan, 2006). Neste estudo, foi utilizado o menor volume possível de DMSO necessário para a diluição dos compostos na concentração pretendida, que corresponde precisamente a 0.1 mL/kg de DMSO 100% (v/v), contudo a administração procedeu-se por via subcutânea, uma via menos invasiva e com menor biodisponibilidade, pelo que se considera que a dose injetada corresponde a uma dose abaixo do limite de toxicidade. Desta forma, a hipótese do potencial efeito tóxico do DMSO parece improvável. No que diz respeito ao stress induzido pelas injeções subcutâneas diárias, apesar desta técnica ser minimamente invasiva, as administrações repetidas podem resultar numa maior irritação e em danos induzidos pela agulha, acompanhados da dor, o que pode culminar em stress para o animal (Turner *et al.*, 2011). Como tal, apesar do reduzido número de injeções neste estudo, observou-se uma diminuição da ingestão calórica, que efetivamente pode ser provocada por esse procedimento.

Para avaliar o efeito da curcumina no metabolismo da glicose, os valores de glicemia foram monitorizados ao longo do estudo. Relativamente à curcumina, os vários estudos realizados comprovaram que o polifenol tem atividade hipoglicémica, quando administrado em doses na ordem dos 80-250 mg/kg durante tratamentos de 2 a 8 semanas (El-moselhy *et al.*, 2011; Na *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2008; Su, Wang e Chi, 2017). Contudo, tal não se verificou neste estudo uma vez que a dose de curcumina administrada, 40 mg/kg/dia, não foi suficiente para baixar significativamente a glicemia. Relativamente ao Derivado 27, utilizado em quantidades equimolares, observou-se uma diminuição significativa da glicemia aos 7 dias de tratamento, sendo aos 14 dias de tratamento muito acentuada. Como tal, o efeito hipoglicemiante da curcumina foi notavelmente potenciado pelo Derivado 27. Ao contrário das evidências de melhoria do perfil lipídico noutros estudos, observou-se um aumento dos níveis plasmáticos dos FFA nos animais tratados com curcumina, o que pode estar associado à baixa dose administrada, quando comparada com os estudos anteriores (El-moselhy *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2017; Su, Wang e Chi, 2017). Contudo, relativamente aos restantes grupos, observou-se uma diminuição significativa dos níveis de FFA nos animais tratados com Derivado 20, e mais acentuada nos animais tratados com Derivado 27, comparativamente com o grupo tratado com curcumina. Tal facto evidencia, mais uma vez, uma potenciação dos efeitos com o tratamento com os derivados em estudo.

De forma a elucidar os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos observados, procedeu-se à determinação dos níveis proteicos do GLUT4, observando-se um aumento significativo nos grupos tratados com curcumina e com o Derivado 27. Estes resultados são consistentes com o aumento dos níveis do GLUT4 observados em estudos anteriores com a curcumina, em modelos *in vitro*, na linha celular de miotubos L6, e *in vivo*, em ratos Wistar e ratos com doença de Alzheimer induzida pela administração de escopolamina (Cheng *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2019; Na *et al.*, 2011). Tendo em conta estes resultados, o tratamento com o Derivado 27 parece ter efeitos a nível metabólico, na medida em que melhora os perfis glicémico e lipídico, pela diminuição dos ácidos gordos plasmáticos. O aumento dos ácidos gordos resulta de uma diminuição da esterificação ou da oxidação lipídica na mitocôndria, verificando-se um aumento dos intermediários envolvidos, com repercussões na sinalização de insulina e no menor aporte de glicose para a célula (Matafome e Seíça, 2017). Desta forma, a diminuição dos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres acompanhada pelo aumento dos níveis do transportador de glicose, GLUT4, promovidos pelo tratamento com o Derivado 27, irão contribuir para uma melhoria da captação de glicose para as células, e consequente diminuição dos valores de glicemia.

Tal como referido anteriormente, a função microvascular encontra-se afetada na diabetes, na medida em que a patologia induz alterações que culminam no desenvolvimento de disfunção endotelial. O aumento do stress oxidativo, com consequente diminuição da biodisponibilidade de NO, é responsável pela alteração da vasodilatação dependente do endotélio, promovendo o desenvolvimento de aterosclerose e das complicações vasculares da T2DM (Brownlee, 2001; Rask-Madsen e King, 2007). Neste contexto, avaliou-se o efeito dos derivados da curcumina na resposta vasorrelaxante induzida pela ACh na aorta isolada, na ausência e na presença de ácido ascórbico, com a finalidade de avaliar os seus efeitos no estado oxidativo e na resposta vasorrelaxante NO-dependente.

Efetivamente, a curcumina aumentou o relaxamento máximo induzido pela ACh na aorta isolada dos animais diabéticos submetidos ao polifenol comparativamente ao respetivo grupo controlo, tal como já tinha sido demonstrado por Tsai e colaboradores (Tsai *et al.*, 2018). Contudo, após incubação com ácido ascórbico, este efeito foi limitado, o que demonstra que o ácido ascórbico não afeta a resposta à acetilcolina no grupo tratado com curcumina. Estes resultados estão de acordo com um estudo realizado no modelo *in vivo* de ratos com Síndrome de Rett, tratados com curcumina, no qual verificaram que os vasos isolados relaxavam mais à ACh, porém na presença de ácido ascórbico, não foi visível nenhum efeito adicional (Panighini *et al.*, 2013). Relativamente ao grupo tratado com Derivado 20, não

se observaram diferenças significativas na resposta vasorrelaxante à ACh, comparativamente com o grupo controlo, contudo, na presença de ácido ascórbico, houve uma exacerbação da resposta. Com o Derivado 27, tanto se observou um aumento significativo do relaxamento induzido pela ACh, como este foi marcadamente exacerbado pela presença de ácido ascórbico.

Não se tendo verificado alterações significativas nas vias de sinalização envolvidas no vasorrelaxamento, nomeadamente nas formas total e fosforilada na eNOS e nas vias de detoxificação das aorta isoladas dos diferentes grupos experimentais, os resultados dos estudos funcionais e dos perfis glicémico e lipídico sugerem que o tratamento com o Derivado 27 promove um melhor funcionamento endotelial, o que pode estar relacionado com a redução da glicemia e consequente diminuição do stress oxidativo.

A avaliação do stress nitrosativo, embora preliminar, parece corroborar esta hipótese, uma vez que o Derivado 27 parece diminuir a imunomarcção da nitrotirosina observada nos estudos de imunohistoquímica. A nitrotirosina é formada a partir do anião peroxinitrito que, por sua vez, tem origem na reação do NO com as ROS e leva à oxidação do co-factor da eNOS, o BH<sub>4</sub>. Perante concentrações insuficientes de BH<sub>4</sub>, a eNOS fica desacoplada, doando eletrões a moléculas de oxigénio, formando o anião superóxido em vez de NO, diminuindo a biodisponibilidade deste potente vasodilatador. Assim sendo, a aparente diminuição da nitrotirosina, pode traduzir uma melhoria na biodisponibilidade do NO, com consequente melhoria da função endotelial.

Embora não se tenham verificado alterações nas vias de resposta antioxidantes na aorta, estes mecanismos foram avaliados noutros tecidos alvo de lesões microvasculares na T2DM. Também não se verificaram alterações no rim, contudo o efeito antioxidante do Derivado 27 foi confirmado no tecido adiposo epididimal, um tecido que é altamente dependente da sua função vascular e em que a disfunção microvascular ocorre ao longo da disfunção do próprio tecido (Rodrigues, Matafome e Seíça, 2014). Assim, verificou-se uma normalização dos níveis de GLOI e um aumento os níveis de SODI no tecido adiposo epididimal do grupo Derivado 27, estando ambas as enzimas envolvidas na resposta ao stress oxidativo. A GLOI é responsável pela detoxificação de um precursor de AGEs, o metilglioxal, que é capaz de aumentar a formação das ROS, diminuir a capacidade antioxidante das células, diminuir os níveis de GLOI e aumentar a atividade de enzimas pro-oxidantes, o que contribui para a deterioração da função endotelial (Matafome, Sena e Seíça, 2013; Sena *et al.*, 2012). Desta forma, a normalização dos níveis da GLOI pelo Derivado 27 poderá atenuar os efeitos do

precursor, contribuindo para a melhoria da função vascular. O aumento dos níveis da SOD I traduz igualmente uma melhoria na função vascular, visto que esta enzima é responsável pela neutralização das ROS, mecanismo subjacente à diminuição do stress oxidativo.

Tendo em consideração estes resultados, o tratamento com o Derivado 27 melhorou os perfis glicémico e lipídico, com conseqüente diminuição do stress oxidativo, o que se traduziu na melhoria da função endotelial.

# **Capítulo VII**

## **Conclusão e Perspetivas Futuras**

## Conclusão e Perspetivas Futuras

Atualmente, as terapêuticas comumente utilizadas na T2DM têm limitações, no que concerne à prevenção do desenvolvimento das complicações, pelo que a procura de terapêuticas mais eficazes tem sido alvo de extensa investigação. Uma vez que os compostos naturais proporcionam um efeito pleiotrópico particularmente relevante, têm sido extensivamente estudados nesse contexto, muitos dos quais detêm evidência científica comprovada. Em particular, a curcumina tem sido alvo de várias abordagens da química medicinal, cuja finalidade é melhorar as suas propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. No entanto, essas estratégias têm apresentado limitações, pelo que, neste projeto, foram estudados dois novos derivados da Curcumina, o Derivado 20 e o Derivado 27, cujo objetivo foi potenciar os efeitos do polifenol.

O Derivado 27 mostrou ter efeito hipoglicémico, suportado pelo aumento do GLUT4 e pela diminuição dos níveis plasmáticos de ácidos gordos. Paralelamente, este derivado melhorou a função vascular, tendo-se observado uma normalização dos níveis de GLO1 e um aumento dos níveis de SOD-I no tecido adiposo, traduzindo-se numa diminuição do stress oxidativo. Assim sendo, estes resultados suportam a hipótese de que o Derivado altera o estado oxidativo, melhorando a função vascular, o que, a longo-prazo pode prevenir o desenvolvimento de complicações cardiovasculares na DM, secundárias à disfunção endotelial.

No futuro, será dada continuidade aos estudos de imunohistoquímica de imunomarcagem da nitrotirosina, com aumento no número de amostras, de forma a confirmar o resultado obtido. Serão igualmente realizados estudos de imunohistoquímica com marcadores de stress oxidativo, com recurso à sonda de dihidroetídio (*dihydroethidium*, DHE) e à sonda de diclorodihidrofluoresceína diacetato (*dichlorodihydrofluorescein diacetate*, DCFH<sub>2</sub>-DA). De modo a estudar a influência do tratamento noutras complicações da T2DM, serão realizadas análises patológicas ao rim. Serão ainda avaliados os níveis de marcadores de stress oxidativo no coração, de modo a avaliar o efeito dos derivados nas complicações cardiovasculares de forma mais direta, com recurso à técnica de Western Blotting. Seria igualmente interessante a realização de estudos farmacocinéticos, de forma a comparar a concentração plasmática do Derivado 27 com a concentração plasmática da curcumina. Por fim, em função dos resultados obtidos, postula-se a hipótese de conjugar o Derivado 27 com uma molécula que confira maior biodisponibilidade, que combinaria a potenciação dos efeitos da curcumina observada com o aumento da sua biodisponibilidade, formando um bioconjugado eficaz como adjuvante da terapêutica da T2DM.

# **Capítulo VIII**

## **Referências**

## Referências

AGGARWAL, Bharat B. *et al.* - Curcumin: the Indian solid gold. **Advances in experimental medicine and biology**. 595 (2007) 1–75.

AGGARWAL, Bharat B.; HARIKUMAR, Kuzhuvilil B. - Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 41:1 (2009) 40–59.

AGGARWAL, Bharat B.; KUMAR, Anushree; BHARTI, Alok Chandra - Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer research**. 23:1A (2002) 363–398.

AGGARWAL, Sita *et al.* - Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I $\kappa$ B kinase and Akt activation. **Molecular pharmacology**. 69:1 (2006) 195–206.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**. 33:S1 (2010) S62–S69.

AMMON, H. P. T.; WAHL, M. A. - Pharmacology of Curcuma longa. **Planta medica**. 57:1 (1991) 1–7.

ANAND, Preetha *et al.* - Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**. 4:6 (2007) 807–818.

ANAND, Preetha *et al.* - Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**. 76:11 (2008) 1590–1611.

BALOGUN, Elisabeth *et al.* - Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochemical Journal**. 371:3 (2003) 887–895.

BALSTAD, Trude Rakel *et al.* - Coffee, broccoli and spices are strong inducers of electrophile response element-dependent transcription in vitro and in vivo – Studies in electrophile response element transgenic mice. **Molecular Nutrition & Food Research**. 55:2 (2011) 185–197.

BAYRAK, Omer *et al.* - Lutein protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. **World Journal of Urology**. 26:3 (2008) 285–291.

BAYS, Harold; MANDARINO, Lawrence; DEFRONZO, Ralph A. - Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 89:2 (2004) 463–478.

BHARTI, Alok C. *et al.* - Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. **Blood**. 101:3 (2003) 1053–1062.

BROWNLEE, M. - Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. 414:6865 (2001) 813–820.

BULBOACĂ, Angelo Corneliu Adriana Elena *et al.* - Liposomal Curcumin is Better than Curcumin to Alleviate Complications in Experimental Diabetic Mellitus. **Molecules**. 24:5 (2019) 846.

BYUN, Mi-Sun; CHOI, Jin; JUE, Dae-Myung - Cysteine-179 of I $\kappa$ B kinase beta plays a critical role in enzyme activation by promoting phosphorylation of activation loop serines. **Experimental & molecular medicine**. 38:5 (2006) 546–52.

CABALLERO, A. Enrique - Metabolic and Vascular Abnormalities in Subjects at Risk for Type 2 Diabetes: The Early Start of a Dangerous Situation. **Archives of Medical Research**. 36:3 (2005) 241–249.

CERSOSIMO, Eugenio; DEFRONZO, Ralph A. - Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. 22:6 (2006) 423–436.

CHAINANI-WU, Nita - Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). **The Journal of alternative and complementary medicine**. 9:1 (2003) 161–168.

CHATTOPADHYAY, I. *et al.* - Turmeric and Curcumin: Biological Actions and Medical Applications. **Current Science**. 87:1 (2004) 44–50.

CHAUHAN, Pratibha *et al.* - Chitosan encapsulated nanocurcumin induces GLUT-4 translocation and exhibits enhanced anti-hyperglycemic function. **Life Sciences**. 213 (2018) 226–235.

CHAWLA, Aastha; CHAWLA, Rajeev; JAGGI, Shalini - Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**. 20:4 (2016) 546–551.

CHENG, Ann-Lii *et al.* - Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. **Anticancer research**. 21:4B (2001) 2895–2900.

CHENG, Tse-Chou *et al.* - Activation of muscarinic M-1 cholinceptors by curcumin to increase glucose uptake into skeletal muscle isolated from Wistar rats. **Neuroscience Letters**. 465:3 (2009) 238–241.

Clinical development plan: curcumin. - **Journal of cellular biochemistry**. 26 (1996) 72–85.

COLLABORATORS, GBD 2013 Mortality And Causes Of Death - Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**. 385:9963 (2015) 117–171.

DAS, Tushar Kanti *et al.* - Curcumin Ameliorates the Impaired Insulin Signaling Involved in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease in Rats. **Journal of Alzheimer’s Disease Reports**. 3:1 (2019) 59–70.

DEFRONZO, R. A. - Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. **Diabetologia**. 53:7 (2010) 1270–1287.

DEFRONZO, R. A. *et al.* - Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**. 1 (2015) 15019.

DEFRONZO, R. A. Ralph A. - Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The Medical Clinics of North America**. 88:4 (2004) 787–835.

DELHASE, M. *et al.* - Positive and Negative Regulation of I $\kappa$ B Kinase Activity Through IKK $\beta$  Subunit Phosphorylation. **Science**. 284:5412 (1999) 309–313.

EDWARDS, Katie A.; BAEUMNER, Antje J. - Liposomes in analyses. **Talanta**. 68:5 (2006) 1421–1431.

EDWARDS, Rebecca L. *et al.* - The anti-inflammatory activity of curcumin is mediated by its oxidative metabolites. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**. 292:52 (2017) 21243–21252.

EL-MOSELHY, Mohamed A. *et al.* - The antihyperglycemic effect of curcumin in high fat diet fed rats. Role of TNF- $\alpha$  and free fatty acids. **Food and Chemical Toxicology**. 49:5 (2011) 1129–1140.

ESATBEYOGLU, Tuba *et al.* - Curcumin—From Molecule to Biological Function. **Angewandte Chemie International Edition**. 51:22 (2012) 5308–5332.

- FAN, Xia *et al.* - The Clinical Applications of Curcumin: Current State and the Future. **Current Pharmaceutical Design**. 19:11 (2013) 2011–2031.
- FRANÇA, Bruna Karoline *et al.* - Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**. 20:5 (2013) 199–206.
- GERICH, J. E. - Pathogenesis and Treatment of Type 2 (Noninsulin-Dependent) Diabetes Mellitus (NIDDM). **Hormone and Metabolic Research**. 28 (1996) 404–412.
- GHOSH, Sankar; HAYDEN, Matthew S. - New regulators of NF- $\kappa$ B in inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 8:11 (2008) 837–848.
- GHOSH, Shatadal; BANERJEE, Sharmistha; SIL, Parames C. - The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food and Chemical Toxicology**. 83 (2015) 111–124.
- GOEL, Ajay; BOLAND, C. Richar. Richard; CHAUHAN, Dharam P. - Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. **Cancer Letters**. 172:2 (2001) 111–118.
- GORDON, O. N. *et al.* - Unraveling curcumin degradation: autoxidation proceeds through spiroepoxide and vinyl ether intermediates en route to the main bicyclopentadione. **The Journal of biological chemistry**. 290:8 (2015) 4817–4828.
- GORDON, Odaine N. *et al.* - Oxidative Transformation of Demethoxy- and Bisdemethoxycurcumin: Products, Mechanism of Formation, and Poisoning of Human Topoisomerase II $\alpha$ . **Chemical Research in Toxicology**. 28:5 (2015) 989–996.
- GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. - Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. **The AAPS Journal**. 15:1 (2013) 195–218.
- GUPTA, Subash C. *et al.* - Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 39:3 (2012) 283–299.
- GUTTERIDGE, John M. C. - Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**. 41:12 (1995) 1819–1828.
- HADI, H. A. R.; SUWAIDI, J. A. - Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Vascular health and risk management**. 3:6 (2007) 853–876.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew - Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. 142:2 (2004) 231–255.

HE, Z.; KING, G. L. - Microvascular complications of diabetes. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**. 33:1 (2004) 215–238.

HUEBSCHMANN, A. G. *et al.* - Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products. **Diabetes Care**. 29:6 (2006) 1420–1432.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - **IDF Diabetes Atlas, 8th edn.** [Em linha]  
Disponível em WWW:<URL:<http://www.diabetesatlas.org>>.

IRESON, C. R. *et al.* - Metabolism of the Cancer Chemopreventive Agent Curcumin in Human and Rat Intestine. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. 11:1 (2002) 105–111.

JOBIN, Christian *et al.* - Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF- $\kappa$ B Activation and Proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I- $\kappa$ B Kinase Activity. **The Journal of immunology**. 163:6 (1999) 3474–3483.

KAHN, S. E. - The importance of the  $\beta$ -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine**. 108:6a (2000) 2S-8S.

KAHN, S. E. *et al.* - Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: Perspectives on the past, present, and future. **The Lancet**. 383:9922 (2014) 1068–1083.

KANAI, Masashi *et al.* - Dose-escalation and pharmacokinetic study of nanoparticle curcumin, a potential anticancer agent with improved bioavailability, in healthy human volunteers. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 69:1 (2012) 65–70.

KANAI, Masashi *et al.* - A phase I study investigating the safety and pharmacokinetics of highly bioavailable curcumin (Theracurmin®) in cancer patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 71:6 (2013) 1521–1530.

KATAKAM, P. V. G. *et al.* - Cerebrovascular Responses to Insulin in Rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. 29:12 (2009) 1955.

KAWAHITO, Shinji; KITAHATA, Hiroshi; OSHITA, Shuzo - Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. **World Journal of Gastroenterology**. 15:33 (2009) 4137–4142.

- KOO, Hyun-Jung *et al.* - Introduction of Methyl Groups at C2 and C6 Positions Enhances the Antiangiogenesis Activity of Curcumin. **Scientific reports**. 5 (2015) 14205.
- KUMAR, S. *et al.* - Design and synthesis of curcumin-bioconjugates to improve systemic delivery. **Nucleic acids symposium series**. 44 (2000) 75–76.
- LAO, Christopher D. *et al.* - Dose escalation of a curcuminoid formulation. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6:10 (2006).
- LECLERCQ, Isabelle A. *et al.* - Curcumin inhibits NF- $\kappa$ B activation and reduces the severity of experimental steatohepatitis in mice. **Journal of Hepatology**. 41:6 (2004) 926–934.
- LOPES, Ana Patrícia Sequeira - **Síntese de novos análogos de curcumina com potenciais atividades biológicas**. [Em linha]. [S.l.] : Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2018. Dissertação de mestrado, 2018 Disponível em WWW:<URL:http://hdl.handle.net/10400.21/10155>.
- LUDVIK, Bernhard *et al.* - Decrease of Stimulated Amylin Release Precedes Impairment of Insulin Secretion in Type II Diabetes. **Diabetes**. 40:12 (1991) 1615–1619.
- MAAMOUN, Hatem *et al.* - Endoplasmic Reticulum Stress: A Critical Molecular Driver of Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disturbances Associated with Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**. 20:7 (2019) E1658.
- MATAFOME, Paulo *et al.* - Methylglyoxal in Metabolic Disorders: Facts, Myths, and Promises. **Medicinal Research Reviews**. 37:2 (2017) 368–403.
- MATAFOME, Paulo; SEIÇA, Raquel - Function and Dysfunction of Adipose Tissue. **Advances in neurobiology**. 19 (2017) 3–31.
- MATAFOME, Paulo; SENA, Cristina; SEIÇA, Raquel - Methylglyoxal, obesity, and diabetes. **Endocrine**. 43:3 (2013) 472–484.
- MEGHANA, Kanitkar; SANJEEV, Galande; RAMESH, Bhonde - Curcumin prevents streptozotocin-induced islet damage by scavenging free radicals: A prophylactic and protective role. **European Journal of Pharmacology**. 577:1 (2007) 183–191.
- MILOBEDZKA, J.; KOSTANECKI, S.; LAMPE, V. - Zur Kenntnis des Curcumins. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**. 43:2 (1910) 2163–2170.
- MISHRA, Satyendra *et al.* - Design, development and synthesis of mixed bioconjugates of piperic acid-glycine, curcumin-glycine/alanine and curcumin-glycine-piperic acid and their antibacterial and antifungal properties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 13:5 (2005) 1477–1486.

- NA, L. X. *et al.* - Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. 21:7 (2011) 526–533.
- NABAVI, Seyed Fazel *et al.* - Curcumin: a natural product for diabetes and its complications. **Current topics in medicinal chemistry**. 15:23 (2015) 2445–55.
- NEERVANNAN, Seshadri - Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**. 2:5 (2006) 715–731.
- NIGRO, Cecilia *et al.* - Methylglyoxal-Glyoxalase I Balance: The Root of Vascular Damage. **International journal of molecular sciences**. 18:1 (2017) 188.
- OSTENSON, C. G. - The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. **Acta Physiologica Scandinavica**. 171:3 (2001) 241–247.
- PACHER, Pál; BECKMAN, Joseph S.; LIAUDET, Lucas - Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiological Reviews**. 87:1 (2007) 315–424.
- PAN, Min-Hsiung; HUANG, Tsang-Miao; LIN, Jen-Kun - Biotransformation of Curcumin Through Reduction and Glucuronidation in Mice. **Drug Metabolism and Disposition**. 27:1 (1999) 486–494.
- PAN, Yanyun *et al.* - Curcumin improves glycolipid metabolism through regulating peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  signalling pathway in high-fat diet-induced obese mice and 3T3-L1 adipocytes. **Royal Society Open Science**. 4:11 (2017) 170917.
- PAN, Yong *et al.* - Attenuation of high-glucose-induced inflammatory response by a novel curcumin derivative B06 contributes to its protection from diabetic pathogenic changes in rat kidney and heart. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 24:1 (2013) 146–155.
- PANIGHINI, Anna *et al.* - Vascular Dysfunction in a Mouse Model of Rett Syndrome and Effects of Curcumin Treatment. **PLOS ONE**. 8:5 (2013) e64863.
- PATTI, Mary Elizabeth *et al.* - Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **PNAS**. 100:14 (2003) 8466–8471.
- POTENZA, Maria Assunta *et al.* - Endothelial Dysfunction in Diabetes: From Mechanisms to Therapeutic Targets. **Current Medicinal Chemistry**. 16:1 (2009) 94–112.
- PRASAD, D. N. *et al.* - Studies on ulcerogenic activity of curcumin. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. 20 (1979) 92.

PRASAD, Sahdeo; TYAGI, Amit K.; AGGARWAL, Bharat B. - Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Research and Treatment**. 46:1 (2014) 2–18.

PRIYADARSINI, K. Indira - Free radical reactions of curcumin in membrane models. **Free Radical Biology and Medicine**. 23:6 (1997) 838–843.

PRIYADARSINI, K. Indira - Chemical and Structural Features Influencing the Biological Activity of Curcumin. **Current Pharmaceutical Design**. 19:11 (2013) 2093–2100.

PRIYADARSINI, Kavirayani Indira - The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**. 19 (2014) 20091–20112.

QUYYUMI, Arshed A. - Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**. 105:1A (1998) 32S-39S.

RAI, Diwakar *et al.* - Design and development of curcumin bioconjugates as antiviral agents. **Nucleic acids symposium series**. 52 (2008) 599–600.

RAO, Chinthalapally V - Regulation of COX and LOX by curcumin. **Advances in experimental medicine and biology**. 595 (2007) 213–226.

RASK-MADSEN, Christian; KING, George L. - Mechanisms of disease: Endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. **Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism**. 3:1 (2007) 46–56.

RAVINDRAN, P. - Turmeric — The Golden Spice of Life. Em **Turmeric: The Genus Curcuma**. ISBN 13: 978-0-8493-7034-2. p. 14.

RAVINDRANATH, Vijayalaksmi; CHANDRASEKHARA, Nanajundiah - Metabolism of curcumin-studies with [3H]curcumin. **Toxicology**. 22:4 (1981) 337–344.

RIVERA-MANCIÁ, Susana; LOZADA-GARCÍA, María Concepción; PEDRAZA-CHAVERRI, José - Experimental evidence for curcumin and its analogs for management of diabetes mellitus and its associated complications. **European Journal of Pharmacology**. 756 (2015) 30–37.

RODRIGUES, Tiago; MATAFOME, Paulo; SEIÇA, Raquel - A vascular piece in the puzzle of adipose tissue dysfunction: mechanisms and consequences. **Archives of Physiology and Biochemistry**. 120:1 (2014) 1–11.

- ROLO, Anabela P.; PALMEIRA, Carlos M. - Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 212:2 (2006) 167–178.
- SANIDAD, Katherine Z. *et al.* - Effects of Stable Degradation Products of Curcumin on Cancer Cell Proliferation and Inflammation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 64:48 (2016) 9189–9195.
- SAREEN, Rashmi; JAIN, Nitin; DHAR, K. L. - Curcumin–Zn(II) complex for enhanced solubility and stability: an approach for improved delivery and pharmacodynamic effects. **Pharmaceutical Development and Technology**. 21:5 (2016) 630–635.
- SCHRAUFSTATTER, E.; BERNT, H. - Antibacterial Action of Curcumin and Related Compounds. **Nature**. 164:4167 (1949) 456–457.
- SENA, Cristina M. *et al.* - Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. **Pharmacological Research**. 65:5 (2012) 497–506.
- SEO, Kwon-Il *et al.* - Effect of curcumin supplementation on blood glucose, plasma insulin, and glucose homeostasis related enzyme activities in diabetic db/db mice. **Molecular Nutrition & Food Research**. 52:9 (2008) 995–1004.
- SHAHED, A. R.; JONES, E.; SHOSKES, D. - Quercetin and Curcumin Up-Regulate Antioxidant Gene Expression in Rat Kidney after Ureteral Obstruction or Ischemia/Reperfusion Injury. **Transplantation Proceedings**. 33:6 (2001) 2988.
- SHAKERI, Abolfazl *et al.* - Biological properties of metal complexes of curcumin. **BioFactors**. 45:3 (2019) 304–317.
- SHALINI, V. K.; SRINIVAS, Leela - Lipid peroxide induced DNA damage: protection by turmeric (*Curcuma longa*). **Molecular and Cellular Biochemistry**. 77:1 (1987) 3–10.
- SHARMA, Ricky A. *et al.* - Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin: Biomarkers of Systemic Activity and Compliance. **Clinical Cancer Research**. 10:20 (2004) 6847–6854.
- SHARMA, Sameer; KULKARNI, Shrinivas K.; CHOPRA, Kanwaljit - CURCUMIN, THE ACTIVE PRINCIPLE OF TURMERIC (*CURCUMA LONGA*), AMELIORATES DIABETIC NEPHROPATHY IN RATS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 33:10 (2006) 940–945.
- SHOBA, G. *et al.* - Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. **Planta medica**. 64:4 (1998) 353–356.

SILVA, Sónia A.; MARQUES, Francisco B.; RIBEIRO, Carlos A. Fontes - Characterization of the human basilar artery contractile response to 5-HT and triptans. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 21:3 (2007) 265–272.

SINGH, Ramendra K. *et al.* - Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 45:3 (2010) 1078–1086.

SINGH, Sanjaya; AGGARWAL, Bharat B. - Activation of transcription factor NF-kB is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). **Journal of Biological Chemistry**. 270:42 (1995) 24995–25000.

SINGH, Umang *et al.* - Reactions of reactive oxygen species (ROS) with curcumin analogues: Structure-activity relationship. **Free Radical Research**. 45:3 (2011) 317–325.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE DIABETOLOGIA - **Diabetes: Fatos e Números 2015 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes**. Lisboa : [s.n.]. ISBN 9789899666320.

SOUDAMINI, K. K. *et al.* - Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**. 36:4 (1992) 239–243.

STUMVOLL, Michael; GOLDSTEIN, Barry J.; HAEFTEN, Timon W. VAN - Pathogenesis of Type 2 Diabetes. Em **Type 2 Diabetes: Principles and Practice, Second Edition**. ISBN 9780849379574. p. 13–26.

SU, Li-Qing; WANG, Yong-Di; CHI, Hai-Yan - Effect of curcumin on glucose and lipid metabolism, FFAs and TNF- $\alpha$  in serum of type 2 diabetes mellitus rat models. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 24:8 (2017) 1776–1780.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. - Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. **Indian Journal of Medical Research**. 131:5 (2010) 682–691.

TAHA, C.; KLIP, A. - The insulin signaling pathway. **Journal of Membrane Biology**. 169:1 (1999) 1–12.

TOMEH, Mhd Anas; HADIANAMREI, Roja; ZHAO, Xiubo - A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. **International Journal of Molecular Sciences**. 20:5 (2019) 1033.

TSAI, I. Jung *et al.* - Curcumin supplementation ameliorated vascular dysfunction and improved antioxidant status in rats fed a high-sucrose, high-fat diet. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**. 43:7 (2018) 669–676.

- TURNER, Patricia V *et al.* - Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. 50:5 (2011) 600–613.
- URIBARRI, Jaime *et al.* - Restriction of Advanced Glycation End Products Improves Insulin Resistance in Human Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**. 34:7 (2011) 1610–1616.
- VIRALLY, M. *et al.* - Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. **Diabetes and Metabolism**. 33:4 (2007) 231–244.
- VOGEL, A.; PELLETIER, J. - Examen chimique de la racine de Curcuma. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1 (1915) 289–300.
- WAKABAYASHI, Nobunao *et al.* - Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 101:7 (2004) 2040–2045.
- WEI, Qing-Yi *et al.* - Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1760:1 (2006) 70–77.
- XU, Haiyan *et al.* - Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. 112:12 (2003) 1821–1830.
- YKI-JÄRVINEN, Hannele; MCCLAIN, Donald A. - Glucose toxicity. Em **International Textbook of Diabetes Mellitus. Fourth Edition**. p. 413–425.
- ZHANG, Fan *et al.* - Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. **Carcinogenesis**. 20:3 (1999) 445–451.
- ZHANG, Hanrui; DELLSPERGER, Kevin C.; ZHANG, Cuihua - The link between metabolic abnormalities and endothelial dysfunction in type 2 diabetes: an update. **Basic Research in Cardiology**. 107:1 (2012) 237.
- ZHANG, Jian-Ye Ye *et al.* - Combinational Treatment of Curcumin and Quercetin against Gastric Cancer MGC-803 Cells in Vitro. **Molecules**. 20:6 (2015) 11524–11534.
- ZHENG, Yan; LEY, Sylvia H.; HU, Frank B. - Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**. 14:2 (2017) 88–98.