



2012

Efeito da Berberina em animais obesos; Disfunção endotelial e Síndrome Metabólica

Ana Margarida Pereira



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

### Efeito da Berberina em animais obesos Disfunção endotelial e Síndrome Metabólica

Ana Margarida dos Reis Marques Pereira

2012



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

### Efeito da Berberina em animais obesos Disfunção endotelial e Síndrome Metabólica

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professora Doutora Cristina Sena (Universidade de Coimbra)

Ana Margarida dos Reis Marques Pereira

2012

## AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente à minha orientadora, Professora Doutora Cristina Sena, por todo o apoio, motivação, compreensão e amizade que demonstrou durante este ano lectivo, fundamentais para a evolução deste trabalho.

Agradeço sinceramente à Professora Doutora Raquel Seiça por toda a disponibilidade, amizade e ensinamentos.

À Joana, à Daniela, à Teresa, à Ana e ao Paulo por todos os bons momentos e apoio no laboratório, em especial à Joanhinha por estar sempre disponível para me ajudar e ouvir em todos os momentos!

Agradeço profundamente aos meus pais, a eles devo todo o meu sucesso!

Agradeço ao meu irmão por ser a pessoa que é e estar sempre disponível para mim!

A todos os meus amigos, obrigado por me terem dado todo o apoio, disponibilidade e amizade. Um obrigado especial à Mariana pela companhia neste último ano!

Ao Hugo, o meu melhor amigo, o meu refúgio, muito obrigado por ouvires os meus desabafos e pela ajuda imprescindível em todo o meu percurso académico. Sem ti, não teria sido possível!

A todos o meu sincero obrigado!

Ana Margarida Pereira



# ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABELAS.....	III
ABREVIATURAS.....	V
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 SÍNDROME METABOLICA.....	1
1.1.1 Obesidade.....	1
1.1.1.1 Leptina.....	2
1.1.1.2 Adiponectina.....	2
1.1.2 Resistência à insulina.....	2
1.2 DOENÇAS VASCULARES.....	4
1.3 FUNÇÃO ENDOTELIAL.....	5
1.3.1 Óxido nítrico.....	6
1.3.1.1 Produção de óxido nítrico.....	7
1.3.2 Disfunção endotelial.....	9
1.4 MECANISMOS ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	10
1.4.1 Hiperglicemia.....	10
1.4.2 Resistência à insulina.....	10
1.4.3 Stress oxidativo.....	12
1.5 BERBERINA.....	13
1.5.1 Berberina e o metabolismo lipídico.....	15

1.5.2 Berberina e os efeitos na resistência à insulina e na glicose .....	16
1.5.3 Berberina e os efeitos vasculares .....	17
1.6 OBJECTIVOS .....	18
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 MATERIAIS .....	21
2.1.1 Reagentes químicos e imunológicos .....	21
2.2 MODELOS ANIMAIS E TRATAMENTOS .....	22
2.2.1 Glicemia, hemoglobina A1c e Peso Corporal .....	22
2.2.2 Colheita de sangue .....	22
2.2.3 Sacrifício dos animais e recolha dos órgãos .....	23
2.2.4 Estudos Isométricos .....	23
2.2.5 Determinação dos níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos .....	25
2.2.6 Determinação dos níveis de leptina, adiponectina e insulina.....	25
2.2.7 Determinação dos níveis de ácidos gordos livres.....	25
2.2.8 Homogeneizados da artéria aorta .....	26
2.2.9 Determinação da proteína pelo método do BCA .....	26
2.2.10 Determinação dos níveis de expressão de proteínas por Wertern Blotting.....	26
2.2.11 Stress oxidativo – Sonda dihidroetídio (DHE).....	29
2.2.12 Apresentação dos resultados e análise estatística .....	29
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 PESO CORPORAL, GLICEMIA E HEMOGLOBINA A1C.....	33
3.2 PERFIL LIPÍDICO DOS ANIMAIS: NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL NÃO HDL, TRIGLICERÍDEOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDOS GORDOS LIVRES .....	34
3.3 NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA E ADIPONECTINA.....	35

3.4 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE INSULINA .....	36
3.5 NÍVEIS DE GLICAÇÃO: CML E RAGE .....	38
3.6 RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO.....	41
3.7 MARCADORES DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: ENOS E VASP .....	44
3.8 STRESS OXIDATIVO: SONDA DHE .....	45
3.9 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS: NÍVEIS DE MCP-1 .....	39
3.10 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA AMPK .....	43
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Via de sinalização de Insulina e a sua acção na função vascular.....	3
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo da parede de uma artéria.....	5
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo da produção de NO na célula endotelial e acção do mesmo na célula muscular lisa .....	7
<b>Figura 4:</b> Estrutura dos genes do sintase óxido nítrico. ....	8
<b>Figura 5:</b> Função endotelial dependente de acetilcolina em animais normais na artéria aorta. ....	8
<b>Figura 6:</b> Alteração da via de sinalização da insulina devido à resistência à insulina. ....	11
<b>Figura 7:</b> <i>Berberis vulgaris</i> L. ....	14
<b>Figura 8:</b> Estrutura molecular da berberina .....	14
<b>Figura 9:</b> Acções moleculares da berberina no metabolismo dos lípidos.....	15
<b>Figura 10:</b> Efeito da berberina no metabolismo da glicose. ....	17
<b>Figura 11:</b> Níveis séricos de leptina (painel A) e adiponectina (painel B) .....	36
<b>Figura 12:</b> Efeitos da berberina na insulinemia (painel A) e na resistência à insulina (painel B).....	37
<b>Figura 13:</b> Efeitos da berberina nos níveis de expressão de CML e RAGE na aorta.....	38
<b>Figura 14:</b> Curva dose-resposta à acetilcolina (A) e ao SNP (B) .....	40
<b>Figura 15:</b> Curva dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME .....	41
<b>Figura 16:</b> Efeitos da berberina nos níveis de eNOS na aorta.....	42
<b>Figura 17:</b> Efeitos da berberina nos níveis de VASP na aorta.....	42

<b>Figura 18:</b> Detecção <i>in situ</i> do anião superóxido na artéria aorta nos diferentes grupos de animais em estudo.....	43
<b>Figura 19:</b> Efeitos da berberina nos níveis de expressão do MCP-1 na aorta .....	44
<b>Figura 20:</b> Efeitos da berberina nos níveis de AMPK na aorta. ....	45
<b>Figura 21:</b> Esquema simplificado dos efeitos da berberina na síndrome metabólica que envolvem a activação da AMPK e posterior regulação de um conjunto de parâmetros com influência na função endotelial. ....	60

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Reagentes e produtos mais relevantes do trabalho .....	21
<b>Tabela 2:</b> Curva dose-resposta ao SNP .....	24
<b>Tabela 3:</b> Curva dose-resposta à ACh.....	25
<b>Tabela 4:</b> Soluções utilizadas na técnica de Western Blot.....	29
<b>Tabela 5:</b> Peso corporal, glicemia do jejum e hemoglobina A1c nos diferentes grupos em estudo.....	33
<b>Tabela 6:</b> Níveis séricos de colesterol total, colesterol não-HDL, triglicerídeos e níveis plasmáticos de ácidos gordos livres.....	34
<b>Tabela 7:</b> Percentagem de relaxamento máximo e $-\log EC_{50}$ em segmentos isolados da artéria aorta em resposta à acetilcolina nos diferentes grupos de animais em estudo. ....	39



## ABREVIATURAS

<b>ACE</b>	Enzima de conversão da angiotensina
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADMA</b>	Dimetil-arginina assimétrica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGEs</b>	Produtos finais de glicação avançada
<b>Akt</b>	Proteína cinase B
<b>AMPK</b>	Cinase de adenosina monofosfato
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>aP2</b>	<i>Adipocyte lipid-binding protein</i>
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BBR</b>	Berberina
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetra-hidrobiopterina
<b>BSA</b>	Albumina do soro bovino
<b>cGMP</b>	Monofosfato de guanidina cíclico
<b>CML</b>	N-carboximetil lisina
<b>DDHA</b>	Dimetilarginina dimetilamino-hidrolase
<b>DHE</b>	Di-hidroetídio
<b>EDHF</b>	Factor hiperpolarizante derivado do endotélio
<b>eNOS</b>	Sintase de monóxido de azoto endotelial
<b>ERK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular
<b>ET-1</b>	Endotelina 1

<b>FAD</b>	Dinucleótido de adenina flavina
<b>FMN</b>	Mononucleótido de flavina
<b>Glut</b>	Transportador de glicose
<b>GSH</b>	Glutaciona
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HO<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>ICAM</b>	Molécula de adesão intracelular
<b>iNOS</b>	sintase de monóxido de azoto indutível
<b>IRS-1</b>	Substrato do receptor de insulina 1
<b>JNK</b>	Cinase do factor de transcrição c-Jun
<b>LAM</b>	Molécula de adesão leucocitária
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>LDL-R</b>	Receptor hepático do colesterol associado às LDL
<b>L-NAME</b>	N <sup>ω</sup> Nitro-L-Arginina
<b>MAPK</b>	Cinase das proteínas activadoras da mitogénese
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica para monócitos 1
<b>NADPH</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (fosfato)
<b>nNOS</b>	Sintase de monóxido de azoto neuronal
<b>NO</b>	Monóxido de azoto ou Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintase de monóxido de azoto ou óxido nítrico sintase
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigénio

<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anião superóxido
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PAI-1</b>	Inibidor do activador do plasminogénio 1
<b>PDK-1</b>	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina 2
<b>PH<sub>2</sub></b>	Prostaglandina
<b>Phe</b>	Fenilefrina
<b>PI<sub>3</sub>K</b>	Fosfatidilinositol cinase na posição 3
<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>PPAR<sub>γ</sub></b>	Receptor gama activado por proliferador de peroxissoma
<b>RAGEs</b>	Receptores de produtos finais de glicação avançada
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio
<b>SD</b>	Sprague Dawley
<b>sGC</b>	Guanilato ciclase solúvel
<b>SNP</b>	Nitroprussiato de sódio
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VASP</b>	Fosfoproteína estimulada por vasodilatação
<b>VCAM</b>	Molécula de adesão das células vasculares
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muito baixa densidade
<b>vWF</b>	Factor de Willebrand



## RESUMO

A síndrome metabólica é considerada um estado de inflamação crónica que aumenta a disfunção endotelial precipitando eventos isquémicos cardiovasculares e aumentando a mortalidade. A disfunção endotelial, caracterizada genericamente pela reduzida disponibilidade de óxido nítrico (NO), é uma condição que precede o desenvolvimento precoce de doença macrovascular. A hiperglicemia, a dislipidemia, o *stress* oxidativo e a resistência à insulina estão na génese do desenvolvimento de doenças macrovasculares.

A berberina é um alcalóide natural existente em rizomas e raízes de várias plantas . Foi inicialmente utilizada como um agente destoxicante e anti-inflamatório na medicina chinesa e tem sido associada a benefícios para a saúde. Contudo, ainda não estão completamente esclarecidos os seus efeitos. Este trabalho teve como objectivo estudar o potencial terapêutico da berberina na disfunção endotelial associada à síndrome metabólica induzida por dieta gorda em ratos Sprague - Dawley.

Para isso foram avaliados diferentes grupos de ratos Sprague-Dawley (SD), grupo SD controlo mantido com dieta normal, grupo SD mantido com dieta gorda durante 16 semanas e grupo SD mantido com dieta gorda ao qual foi administrado berberina (100mg/Kg) durante um mês, por via oral. Foram avaliados diferentes biomarcadores metabólicos e de *stress* oxidativo e efectuada a caracterização funcional e estrutural da artéria aorta nos diferentes grupos de animais.

Verificámos que a berberina melhorou o perfil metabólico e a disfunção endotelial e diminuiu os níveis de *stress* oxidativo da parede da artéria aorta.

A berberina tem um potente efeito anti-oxidante e promotor da função endotelial vascular, tendo por isso um elevado potencial terapêutico na síndrome metabólica e suas complicações macrovasculares.

**Palavras-Chave:** Síndrome metabólica, obesidade, doenças macrovasculares, disfunção endotelial, Berberina



## ABSTRACT

The metabolic syndrome is considered a chronic inflammatory state which augments endothelial dysfunction and leads to cardiovascular ischemic events and increase in mortality. It is characterized by a low nitric oxide (NO) bioavailability, endothelial dysfunction together with hyperglycaemia, dislipidemia, oxidative stress and insulin resistance and precede the early conditions involved in the genesis of macrovascular disorders.

Berberine is a natural alkaloid found in rhizomes and roots of a variety of plants. Initially used as a detoxicating and anti-inflammatory agent by traditional Chinese medicine, the beneficial effects of berberine on health are still unravelled.

Therefore, the main aim of this work was to investigate the potential of berberine as a therapeutic approach to endothelial dysfunction in metabolic syndrome induced by high fat diet in non-obese Sprague-Dawley rats (SD). To address this issue different groups of animals were constituted: non-obese Sprague-Dawley rats maintained with a normal diet (control group); SD rats fed with high fat diet for 16 weeks, SD rats fed with normal diet and treated with berberine (100mg/Kg in drinking water) for 1 month. In all groups, both diet and water were administrated *ad libitum*. Different metabolic and oxidative stress biomarkers were investigated as well as functional and structural characterization of aorta artery.

It was observed that berberine is a powerful anti-oxidant, capable of decreasing oxidative stress parameters and improving vascular endothelial function and metabolic profile.

As a result, it is demonstrated that berberine has high potential as a therapeutically tool for metabolic syndrome treatment and its macrovascular complications.

**Keywords:** Metabolic syndrome, obesity, macrovascular diseases, endothelial dysfunction, Berberine.



## **1. INTRODUÇÃO**



## **1.1 SÍNDROME METABÓLICA**

A síndrome metabólica define-se como uma constelação de factores de risco de origem metabólica que são acompanhados pelo aumento de risco de doenças cardiovasculares e de diabetes *mellitus* tipo 2, cuja fisiopatologia subjacente está relacionada com a obesidade (Yang, Yin et al. 2012). Existem várias organizações, como a Organização Mundial de Saúde (OMS) que estabeleceram critérios obrigatórios para se considerar a síndrome metabólica, que incluem a avaliação do perímetro da circunferência abdominal, do nível de glicose em jejum, dos níveis de triglicérides e ainda da pressão arterial (Younus and Rodgers 2011).

Ao longo do tempo têm vindo a propor diferentes definições para a síndrome metabólica. A patogénese e suas componentes é complexa, no entanto, a obesidade central e a resistência à insulina são factores causais importantes. O perímetro abdominal é o factor de rastreio clínico para a síndrome metabólica (Duvnjak and Duvnjak 2009).

### **1.1.1 Obesidade**

A obesidade tem vindo a ser considerada como uma epidemia, uma vez que ao longo dos últimos anos a sua prevalência mundial tem vindo a aumentar. A previsão da OMS para 2015 é de 700 milhões de adultos com obesidade. As principais causas são o modo de vida da população, cada vez mais sedentário e os maus hábitos alimentares. A obesidade é uma patologia complexa com várias causas, que envolvem factores ambientais, a predisposição genética, distúrbios alimentares e mais uma vez a reduzida actividade física.

A obesidade visceral é a mais prejudicial para a saúde e a que está associada com as alterações observadas na síndrome metabólica (Duvnjak and Duvnjak 2009). O tecido adiposo visceral, representa um órgão metabolicamente activo, fortemente relacionado com a sensibilidade à insulina. O tecido adiposo actua assim como um verdadeiro órgão endócrino com hormonas e citocinas com capacidade de modular o estado inflamatório, denominadas adipocitocinas, com efeitos endócrinos, autócrino e parácrinos, que controlam o metabolismo energético do nosso organismo. A excessiva proliferação e diferenciação das células do tecido adiposo levam a uma excessiva acumulação de adipócitos resultando assim na obesidade. A disfunção do tecido adiposo altera a secreção de adipocinas, uma potencial ligação entre a obesidade e a resistência à insulina.

A leptina e a adiponectina são duas das principais adipocinas libertadas pelo tecido adiposo e estão envolvidas em múltiplos efeitos metabólicos (Younus and Rodgers 2011).

### **1.1.1.1 Leptina**

A leptina é uma das adipocinas produzidas pelo tecido adiposo cuja função é fornecer ao cérebro informações sobre o armazenamento de gordura no corpo, controlando a mobilização e utilização dessa reserva energética. A leptina em circulação têm sido bastante estudada e foi demonstrado que, altas concentrações de leptina estão directamente relacionadas com os efeitos adversos da obesidade, tais como, o aumento da resistência à insulina, aumento da inflamação e do risco cardiovascular (Younus and Rodgers 2011; Yang, Yin et al. 2012)

### **1.1.1.2 Adiponectina**

A adiponectina é a hormona mais abundantemente expressa pelo tecido adiposo e é maioritariamente produzida pelo adipócitos (Singh, Arora et al. 2009). A adiponectina é uma hormona com várias funções, aumenta a sensibilidade à insulina, diminui a produção hepática de glicose e, ao nível do músculo esquelético, aumenta a absorção de glicose e a oxidação dos ácidos gordos. Os níveis de adiponectina encontram-se diminuídos na obesidade e estão inversamente correlacionados com a resistência à insulina.

Esta adipocina tem propriedades anti-inflamatórias e melhora a função vascular (Luo, Liu et al. 2010). A adiponectina apresenta também propriedades anti-aterogénicas uma vez que inibe a expressão de moléculas de adesão e a proliferação de células do músculo liso.

A adiponectina diminui a resistência à insulina e ainda os riscos cardiovasculares (Trujillo and Scherer 2005; Younus and Rodgers 2011).

## **1.1.2 Resistência à insulina**

A insulina é uma hormona anabólica hipoglicemiante com um papel muito importante na regulação da glicose, do metabolismo lipídico e proteico e ainda influência o crescimento e a diferenciação celular, a função endotelial e a expressão genética (Duvnjak and Duvnjak 2009).

De modo geral, é possível definir resistência à insulina como uma situação de resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena. Para manter a homeostasia da

glicose é necessário ocorrer um estado de hiperinsulinemia. A hiperinsulinemia resulta da capacidade adaptativa e de reserva da célula  $\beta$ , caso esta célula falhe, ao fim de um período mais ou menos longo de tempo surge a hiperglicemia, uma característica da diabetes (Leahy 2005).

Sob o ponto de vista metabólico a insulino-resistência evidencia-se nas células hepáticas, musculares e adiposas. O músculo e o tecido adiposo são os principais tecidos responsáveis pela utilização periférica da glicose em condições pós-prandiais, assim a diminuição da produção dos transportadores de glicose, em particular o GLUT4 (regulado pela insulina) contribuem para a hiperglicemia pós-prandial (Frayn 2011).

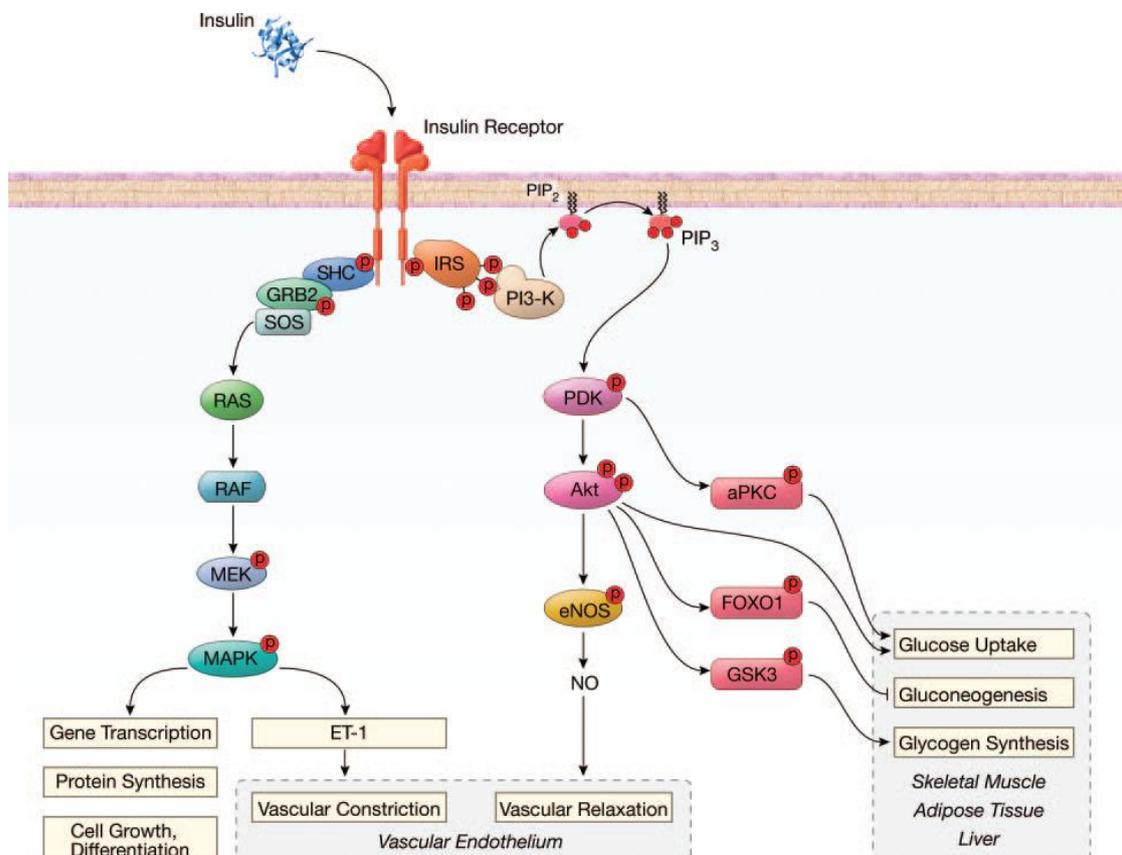


Figura 1: Via de sinalização de Insulina e a sua acção na função vascular. (Adaptado de (Muniyappa, Montagnani et al. 2007)

Outro aspecto importante no que diz respeito à insulina é a sua função vasodilatadora, uma vez que apresenta uma importante acção na estimulação de produção de óxido nítrico ou monóxido de azoto (NO) no endotélio, que promove o relaxamento dos vasos.

Associado à obesidade para além da resistência à insulina surge frequentemente a dislipidemia, caracterizada por alterações do perfil normal dos lípidos e das lipoproteínas no

plasma. Estas alterações incluem a diminuição no plasma dos níveis de colesterol HDL e o aumento dos níveis de triglicérides, colesterol VLDL, colesterol total, LDL e ácidos gordos livres (Avramoglu, Basciano et al. 2006). A resistência à insulina tem sido apontada como uma causa para o desenvolvimento de dislipidemia, sendo os ácidos gordos livres um importante elo entre ambas.

## **1.2 DOENÇAS VASCULARES**

Intimamente relacionado com a síndrome metabólica encontram-se as doenças vasculares que, aumentam a sua prevalência com a obesidade, a dislipidemia, a resistência à insulina, a hiperglicemia e a hipertensão (van den Oever, Raterman et al. 2010). A hiperglicemia desempenha um papel importante nas complicações vasculares (Cade 2008), devido aos seus efeitos adversos principalmente nas células endoteliais. Estas, em condições de hiperglicemia aumentam a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e o *stress* oxidativo implicado na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e na interação dos AGEs com o seu receptor (RAGE) (Negre-Salvayre, Salvayre et al. 2009).

Para além das lesões provocadas pela hiperglicemia, também a obesidade, a dislipidemia, a resistência à insulina e a hipertensão promovem o desenvolvimento constante de lesões ao nível das paredes dos vasos sanguíneos, que se manifestam através do desenvolvimento de disfunção endotelial (van den Oever, Raterman et al. 2010). A disfunção endotelial é um marcador precoce de doenças macro e microvasculares (Ergul 2011). As doenças macrovasculares estão associadas à síndrome metabólica e por à obesidade, a alterações na vasodilatação devido à diminuição da biodisponibilidade de NO, à disfunção das células musculares lisas, à elevada produção de factores de crescimento endotelial e ao aumento da agregação de plaquetas nos vasos (Cade 2008).

### 1.3 FUNÇÃO ENDOTELIAL

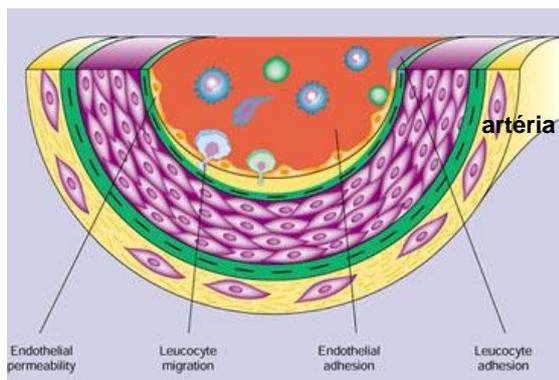


Figura 2: Esquema representativo da parede de uma

O endotélio é uma monocamada de células que reveste o lúmen dos vasos sanguíneos e forma uma barreira selectiva entre o sangue circulante e os restantes tecidos corporais (Ley and Reutershan 2006) desempenhando um papel muito importante na homeostase vascular (van den Oever, Raterman et al. 2010). No entanto, o endotélio não é uma mera barreira física mas um tecido endócrino, parácrino e autócrino metabolicamente activo e capaz de produzir substância vasoactivas e reguladoras que exercem um papel fisiológico activo, interagindo com diversos tipos de células, designadamente plaquetas, leucócitos e células musculares lisas (Ley and Reutershan 2006; van den Oever, Raterman et al. 2010).

A regulação do tónus muscular, do equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise, da adesão e da migração de leucócitos, da actividade inflamatória são funções da responsabilidade das células endoteliais (Schalkwijk and Stehouwer 2006). A função das células endoteliais é caracterizada pelos seguintes aspectos:

- i) Possui um papel anticoagulante que promove a manutenção do sangue num estado fluído;
- ii) Controla a troca de células e moléculas entre o sangue e os tecidos corporais;
- iii) Regula o fluxo sanguíneo através da alteração do tónus vascular;
- iv) Apresenta um papel na resposta inflamatória a agentes agressores, promovendo a transmigração de leucócitos do sangue para os tecidos através da expressão de moléculas de adesão e citocinas (Ley and Reutershan 2006).

O endotélio produz substâncias vasoactivas que podem mediar a vasoconstrição ou a vasodilatação (Avogaro, de Kreutzenberg et al. 2008). A produção de vasodilatadores e vasoconstritores geralmente permanece em equilíbrio em condições fisiológicas normais (Hsueh and Quinones 2003). As substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio são

o NO, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o factor hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). As substâncias vasoconstritoras produzidas pelo endotélio são a endotelina-1 (ET-1), a angiotensina II (Ang II), o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e a prostaglandina H<sub>2</sub> (PH<sub>2</sub>) (Guerci, Kearney-Schwartz et al. 2001; Ley and Reutershan 2006; Hadi and Suwaidi 2007; Avogaro, de Kreutzenberg et al. 2008). A manutenção do equilíbrio entre a vasodilatação e a vasoconstrição é fundamental para a regulação do tónus vascular (Hadi and Suwaidi 2007). Este equilíbrio é mantido pelas células endoteliais, integrando estímulos que regulam a função hemodinâmica (Busse and Fleming 2006; Giannotti and Landmesser 2007).

As células endoteliais estão também envolvidas na produção de moléculas específicas que desempenham um papel fundamental na inflamação, designadas moléculas de adesão, entre as quais se destacam as moléculas de adesão leucocitária (LAM), as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e as moléculas de adesão celular vascular (VCAM) (Hadi and Suwaidi 2007).

A Ang II exerce efeitos nas células musculares lisas devido à estimulação da contração, crescimento, proliferação e diferenciação. Também é responsável pela migração de monócitos e estimulação de moléculas de adesão (ICAM, VCAM e LAM) (van den Oever, Raterman et al. 2010). É responsável pelo aumento da expressão da proteína quimiotáctica para monócitos 1 (MCP-1) que promove o movimento de monócitos da parede dos vasos sanguíneos, estimula a agregação plaquetar e activa o dinucleótido de nicotinamida e adenina (fosfato) (NAD(P)H) oxidase que é responsável pela produção de anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Hsueh and Quinones 2003).

O endotélio apresenta um papel importante na renovação da integridade da parede dos vasos sanguíneos (van den Oever, Raterman et al. 2010). É responsável pela produção de moléculas pró-trombóticas tais como o inibidor do activador do plasminogénio 1 (PAI-1) e o factor von Willebrand (vWF) (Tabit, Chung et al. 2010).

### **1.3.1 Óxido nítrico**

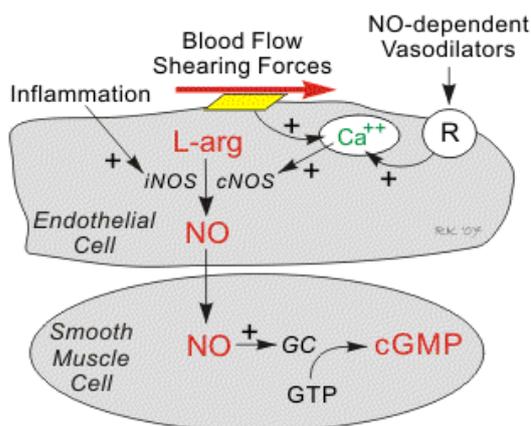
O óxido nítrico é o vasodilatador melhor caracterizado e provavelmente o mais importante. É um gás altamente reactivo e lipofílico (Potenza, Gagliardi et al. 2009), difunde-se rapidamente e apresenta um tempo de meia vida de apenas alguns segundos (Guerci, Kearney-Schwartz et al. 2001), sendo o principal responsável pelo relaxamento dependente do endotélio (Avogaro, de Kreutzenberg et al. 2008).

Este vasodilatador apresenta propriedades antioxidantes, anti-proliferativas, anti-inflamatórias, anti-coagulantes e anti-trombogénicas (Feletou and Vanhoutte 2006), sendo responsável pela regulação de uma diversidade de processos celulares e fisiológicos. O NO

é um componente chave na regulação do tónus vascular do endotélio, da migração e da proliferação de células endoteliais e degradação da matriz extracelular, na função plaquetar bem como na angiogénese e mitogénese que são cruciais na fisiologia vascular. Apresenta ainda a capacidade de inibir a interação de leucócitos com as paredes dos vasos sanguíneos e deste modo reduz a inflamação e os processos pró-trombóticos (Kolluru, 2010). A inibição da adesão de leucócitos pelo NO impede a expressão de VCAM-1 e MCP-1 induzida por citocinas (Schalkwijk and Stehouwer 2006).

### 1.3.1.1 Produção de óxido nítrico

O NO é produzido através da conversão enzimática do aminoácido L-arginina em L-citrulina (Potenza, Gagliardi et al. 2009), esta reacção é mediada pelo complexo enzimático sintase de monóxido de azoto (NOS) (figura 3) (Avogaro, Fadini et al. 2006; Dudzinski and Michel 2007; Kolluru, Siamwala et al. 2010; van den Oever, Raterman et al. 2010).



**Figura 3: Esquema representativo da produção de NO na célula endotelial e acção do mesmo na célula muscular lisa**

A NOS existe em três isoformas diferentes, a NOS neuronal (nNOS), a NOS indutível (iNOS) e a NOS endotelial (eNOS). A nNOS e a eNOS são activadas pelo cálcio e calmodulina e a sua actividade enzimática depende dos níveis de cálcio intracelular. Enquanto que a iNOS está fortemente ligada à calmodulina e a sua actividade enzimática não depende da concentração de cálcio intracelular, sendo regulada pela indução da transcrição do seu gene (Huang 2003).

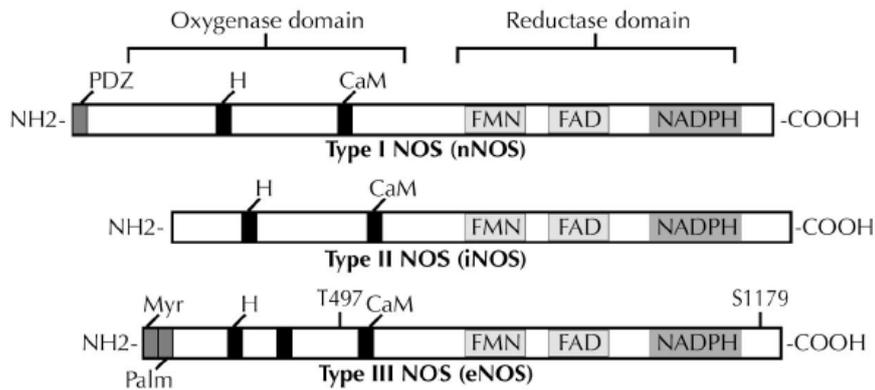


Figura 4: Estrutura dos genes do sintase óxido nítrico. Adaptado de (Huang 2003)

É importante salientar que todas as isoformas da NOS podem ser encontradas em mais do que um tipo de tecido e, para além do endotélio, a eNOS é igualmente expressa em plaquetas, no músculo cardíaco entre outros (Dudzinski and Michel 2007).

A eNOS é uma enzima que actua como homodímero funcional e estruturalmente dividida em dois grandes domínios: um domínio redutase no terminal carboxílico e um domínio oxidase no terminal amínico (figura 4). O terminal carboxílico é o local de ligação para a NADPH, para o dinucleótido de adenina flavina (FAD) e para o mononucleotido de flavina (FMN), enquanto que o terminal amínico contém o local de ligação para o grupo heme e tetra-hidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e para o seu substrato, L-arginina (Li, Everson et al. 2006). Sendo estes os principais substratos e co-factores da eNOS (Kolluru, Siamwala et al. 2010).

A acetilcolina, bradicinina e a serotonina estão entre os activadores da vasodilatação cuja acção é mediada por receptores membranares em artérias com endotélio funcional.

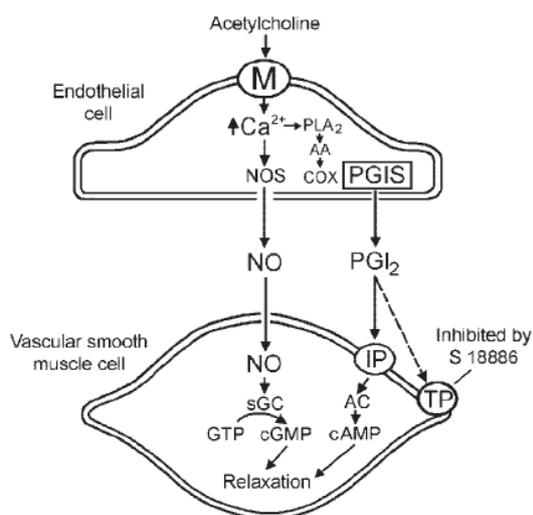


Figura 5: Função endotelial dependente de acetilcolina em animais normais na artéria aorta.

Na figura 5 está representado o mecanismo normal da acção da acetilcolina em artérias com endotélio intacto e funcionalmente normais. A acetilcolina interage com os receptores muscarínicos (M) da célula endotelial promovendo o aumento dos níveis de cálcio intracelulares. Este aumento activa a eNOS que por sua vez aumenta a produção de NO. O NO actua nas células musculares lisas e activa a guanilil ciclase solúvel (sGC), um heterodímero que ocorre na forma de distintas isoformas no tecido vascular. A guanilil ciclase catalisa a defosforilação da guanosina trifosfato (GTP) a guanosina monofosfato cíclica (cGMP), que serve como segundo mensageiro para muitas funções celulares importantes. A cGMP induz o relaxamento muscular devido a vários mecanismos, o aumento dos níveis intracelulares de cGMP leva a uma inibição da entrada de cálcio na célula e uma diminuição da concentração de cálcio intracelular, promovendo o relaxamento muscular. Outro mecanismo mediado pela cGMP é a activação dos canais de potássio, estes hiperpolarizam o músculo liso e ocorre o relaxamento. Por fim, a estimulação de uma proteína cinase dependente de cGMP activa a fosfatase da cadeia leve da miosina que promove a defosforilação da cadeia leve da miosina e leva ao relaxamento do músculo liso (Klabunde 2011).

### **1.3.2 Disfunção endotelial**

O endotélio é um tecido activo com funções fisiológicas importantes na manutenção do equilíbrio hemodinâmico e hemostático. O desempenho anómalo das suas funções é definido como disfunção endotelial, caracterizada clinicamente pela incapacidade das células endoteliais conduzirem a vasodilatação adequada quando estimuladas. Esta disfunção pode ser provocada por *stress* bioquímico ou físico (Yang and Ming 2006) e conduz a um desequilíbrio entre a libertação de vasodilatadores e vasoconstritores (Jansson 2007), aumento da proliferação das células musculares lisas e aumento do estado pró-inflamatório e pró-trombótico no vaso sanguíneo (Feletou and Vanhoutte 2006). A disfunção endotelial é considerada como o primeiro passo na progressão da aterosclerose e doenças cardiovasculares (Potenza, Gagliardi et al. 2009). Na disfunção endotelial verifica-se um aumento das interações com os leucócitos e as células musculares lisas. O endotélio perde as suas propriedades fisiológicas desenvolvendo-se um estado de vasoconstrição, inflamação, coagulação, trombose e proliferação (Feletou and Vanhoutte 2006; van den Oever, Raterman et al. 2010).

O principal marcador de disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade de NO, devido a uma redução da sua produção e/ou a uma perda da sua actividade biológica (van den Oever, Raterman et al. 2010). A redução da bioactividade do NO pode resultar da

diminuição da expressão de eNOS, da reduzida quantidade de co-factores e substratos para a eNOS, de danos na activação da eNOS e do consumo de NO pelas ROS (Feletou and Vanhoutte 2006).

#### **1.4 MECANISMOS ASSOCIADOS À DISFUNÇÃO ENDOTELIAL**

A disfunção endotelial está directamente associada com a hipertensão e a aterosclerose, mas também com processos fisiológicos e patofisiológicos, tais como o envelhecimento, problemas cardiovasculares e renais, inflamação, microalbuminúria, diabetes tipo 1 e 2, intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperglicemia, obesidade, colesterol elevado – síndrome metabólica – *stress* oxidativo, entre outros (Feletou and Vanhoutte 2006).

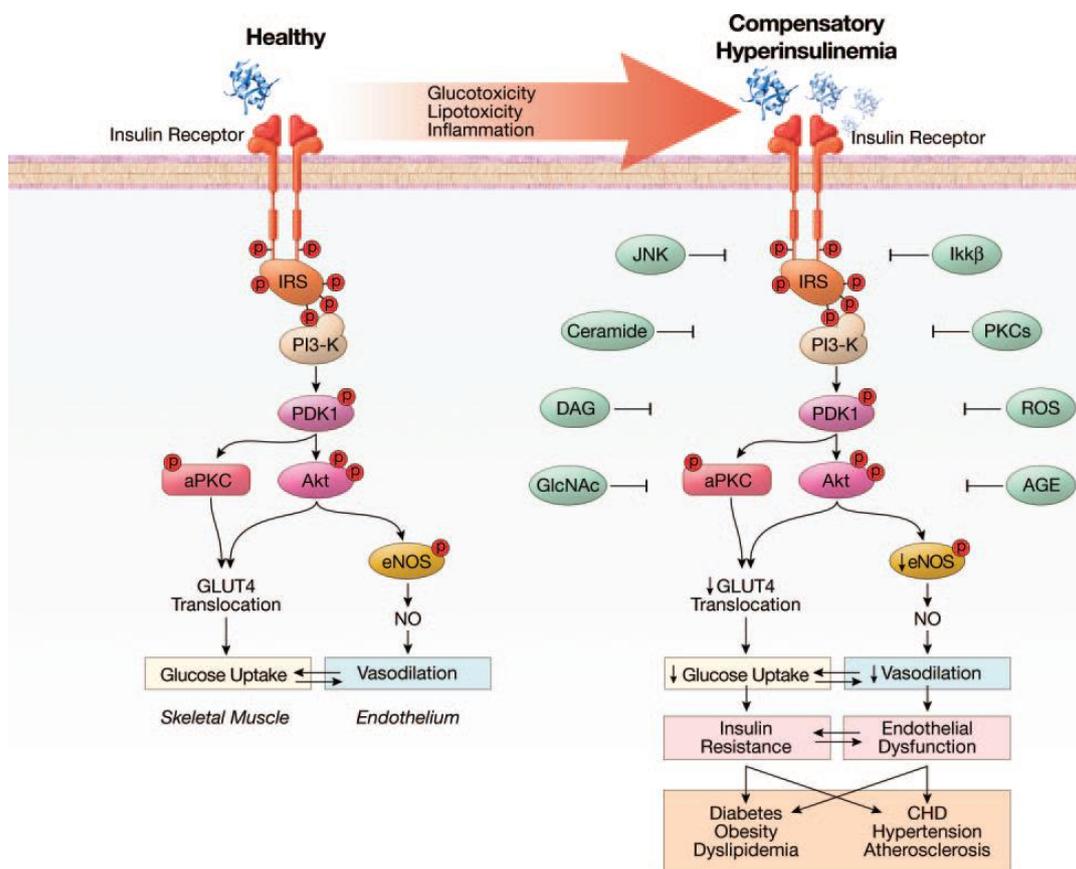
##### **1.4.1 Hiperglicemia**

Níveis elevados de glicose no sangue promovem várias alterações ao nível dos vasos, tais como, disfunção endotelial, proliferação celular, e modificações na matriz extracelular. A presença de uma concentração elevada de glicose no sangue promove um aumento na oxidação de lipoproteínas e leva ainda à activação da via do sorbitol, ao aumento do *stress* oxidativo e à formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e activação dos seus receptores (RAGEs) (Vykoukal and Davies 2011). Associado à hiperglicemia ocorre um aumento do *stress* oxidativo que inibe a actividade enzimática da dimetilarginina dimetilamino-hidrolase (DDHA), que é a enzima que metaboliza a dimetil-arginina assimétrica (ADMA), o que resulta na acumulação deste substracto. Devido à sua estrutura similar com a L-arginina, a ADMA actua como um antagonista competitivo que se liga ao local catalítico da eNOS e inibe a formação de NO, promovendo a vasoconstrição (Potenza, Gagliardi et al. 2009; Dai and Dai 2010).

##### **1.4.2 Resistência à insulina**

A insulina é uma hormona vasoactiva e tem um papel importante na produção de NO no endotélio e consequente vasodilatação, no aumento do fluxo sanguíneo e na captação de glicose pelo músculo esquelético (Wang, Li et al. 2009). A produção de NO em resposta

à insulina resulta na activação do receptor tirosina cinase, que conduz à fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) (figura 6).



**Figura 6: Alteração da via de sinalização da insulina devido à resistência à insulina. Adaptado de (Muniyappa, Montagnani et al. 2007)**

Em seguida, ocorre o recrutamento e a activação da via de sinalização da cinase do fosfatidilinositol na posição 3 ( $PI_3K$ ), que fosforila e activa a proteína cinase B (Akt) através do *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1* (PDK-1). A Akt fosforila directamente a eNOS nos resíduos de serina 1177, resultando num aumento da actividade da eNOS e na produção de NO (Muniyappa, Montagnani et al. 2007; Madonna and De Caterina 2012).

No caso da síndrome metabólica surge inflamação, resistência à insulina e hiperinsulinemia (figura 6) a activação da eNOS pela via PI3K/Akt é inibida, devido a alterações no IRS-1 e na via de sinalização dependente de PI3K resultando na redução da produção de NO nas células endoteliais e na diminuição da translocação do transportador de glicose (GLUT4) nos tecidos periféricos, promovendo-se a disfunção endotelial e a resistência à insulina periférica (Muniyappa, Montagnani et al. 2007; Vykoukal and Davies 2011).

### 1.4.3 Stress oxidativo

O stress oxidativo caracteriza-se por um desequilíbrio entre os sistemas que produzem oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes, resultando num aumento da produção de ROS, na redução da protecção antioxidante e incapacidade de reparar os efeitos produzidos pelas ROS. Em condições normais, existe um equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes com manutenção da homeostase. As ROS são produtos do metabolismo do oxigénio celular e podem produzir efeitos benéficos e prejudiciais. Podem interagir com vias de sinalização intracelular envolvidas no controlo da função vascular, causando danos nos lípidos, no ADN e nas proteínas. Os efeitos patológicos das ROS no sistema cardiovascular resultam simultaneamente das suas acções directas que modificam o funcionamento vascular normal e na capacidade para eliminar e remover vários compostos benéficos, tal como o NO. A interação entre o NO e o anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) ocorre tão rapidamente que diminui as acções fisiológicas do vasodilatador. Esta interação é agora descrita como sendo um dos mecanismos mais relevantes da disfunção endotelial, onde as células endoteliais são incapazes de promover um efeito protector na parede do vaso (Schramm, Matusik et al. 2012). O  $O_2^{\cdot-}$  e o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) são as principais ROS que intervêm na função vascular. O oxigénio é o reponsável pela produção de anião superóxido, que posteriormente pode ser convertido em  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase, a radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ) e a peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) pela reacção directa com o NO (Nedeljkovic, Gokce et al. 2003; Frey, Ushio-Fukai et al. 2009; Dai and Dai 2010).

As ROS são pequenas moléculas de elevada reactividade devido à presença de electrões desemparelhados, sendo produzidas dentro das células através de diversas vias metabólicas e enzimáticas. A principal fonte de produção de ROS é a fosforilação oxidativa mitocondrial. O sistema de fosforilação oxidativa inclui cinco complexos multi-enzimáticos, denominados, complexo I, II, III, IV e ATP (Fatehi-Hassanabad, Chan et al. 2010; Shen 2010). Aproximadamente 4% do  $O_2$  consumido na mitocôndria é convertido em ROS (Shen 2010) e apenas 1 a 2% dos electrões transportados ao longo dos complexos enzimáticos são capazes de reduzir o  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$  que é captado e convertido a  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase. A produção de  $O_2^{\cdot-}$  ocorre principalmente no complexo I (NADP desidrogenase) e no complexo III (ubiquinol-citocromo C oxiredutase) (Ballinger, Patterson et al. 2002).

Para além da fosforilação oxidativa na mitocôndria, as ROS podem ser produzidas por oxidases, designadamente, xantina oxidase, cicloxigenase, lipoxigenase, citocromo P450, peroxidases, NADPH oxidase ou por desacoplamento da eNOS (Fatehi-Hassanabad, Chan et al. 2010). De entre estas enzimas a NADPH oxidase é a principal fonte de produção de ROS nas células endoteliais (Schramm, Matusik et al. 2012). Começam a surgir evidências que apontam para uma correlação entre a actividade da NADPH oxidase e o

desenvolvimento da disfunção endotelial e da aterosclerose (Avogaro, de Kreutzenberg et al. 2008).

Os níveis de ROS e os seus efeitos biológicos são regulados pela capacidade antioxidante dos sistemas biológicos em neutralizar, eliminar e reparar os danos causados nas células (Negre-Salvayre, Salvayre et al. 2009). Os sistemas antioxidantes celulares incluem os sistemas de enzimas antioxidantes, nomeadamente, a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, a catalase, as tioredoxinas, bem como os compostos não enzimáticos, o  $\alpha$ -tocoferol, o  $\beta$ -caroteno, o ascorbato, a glutathione (GSH), entre outros (Frey, Ushio-Fukai et al. 2009; Negre-Salvayre, Salvayre et al. 2009; Schramm, Matusik et al. 2012).

O aumento do *stress* oxidativo na estrutura vascular origina danos na biodisponibilidade do NO (Tabit, Chung et al. 2010). A biodisponibilidade do NO é determinada pelo equilíbrio entre a produção de NO pela eNOS e a redução do NO pelas ROS, particularmente o  $O_2^{\cdot-}$  (Fatehi-Hassanabad, Chan et al. 2010).

O  $O_2^{\cdot-}$  e o  $H_2O_2$  são responsáveis pela oxidação da  $BH_4$  (Forstermann 2010), conduzindo ao desacoplamento da eNOs resultante da transferência de electrões para o  $O_2$  em vez da transferência para a L-arginina (Potenza, Addabbo et al. 2009), aumentando a produção de  $O_2^{\cdot-}$  que reduz a biodisponibilidade de  $BH_4$  e promove o *stress* oxidativo (Dai and Dai 2010; Tabit, Chung et al. 2010). O *stress* oxidativo resulta então numa reduzida biodisponibilidade de NO por uma combinação de eliminação directa e diminuição da sua produção, comprometendo assim a função endotelial (Wallace, Johnson et al. 2010). O desacoplamento da eNOS no endotélio promove a disfunção endotelial e o *stress* oxidativo (Fatehi-Hassanabad, Chan et al. 2010).

## 1.5 BERBERINA

A berberina é um fármaco extraído de plantas da espécie *Berberis vulgaris* L., pertencentes à família da Berberidaceae. Estas plantas crescem em todo o continente asiático e europeu. São também muito conhecidas no Irão, uma vez que são bastante utilizadas para fins medicinais e os seus frutos são utilizados como alimentos (Imanshahidi and Hosseinzadeh 2008).

A planta é um arbusto, com cerca de 1 a 3 metros de altura, espinhoso, dá uma flor amarela e frutos avermelhados (figura 7).



Figura 7: *Berberis vulgaris* L.

A berberina (figura 7) pode ainda ser extraída de outras plantas, tais como, *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Arcangelisia flava* entre outras. Este composto, normalmente encontra-se em maioria nestas plantas, sendo a berberina uma isoquinolina (composto orgânico aromático heterocíclico), é um alcaloide e pertence á classe estrutural das protoberberinas (Imanshahidi and Hosseinzadeh 2008).

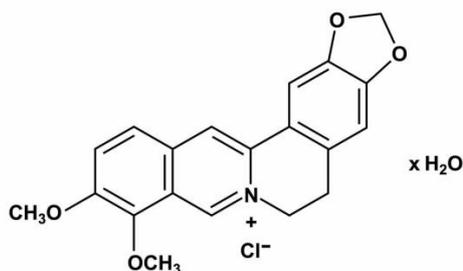


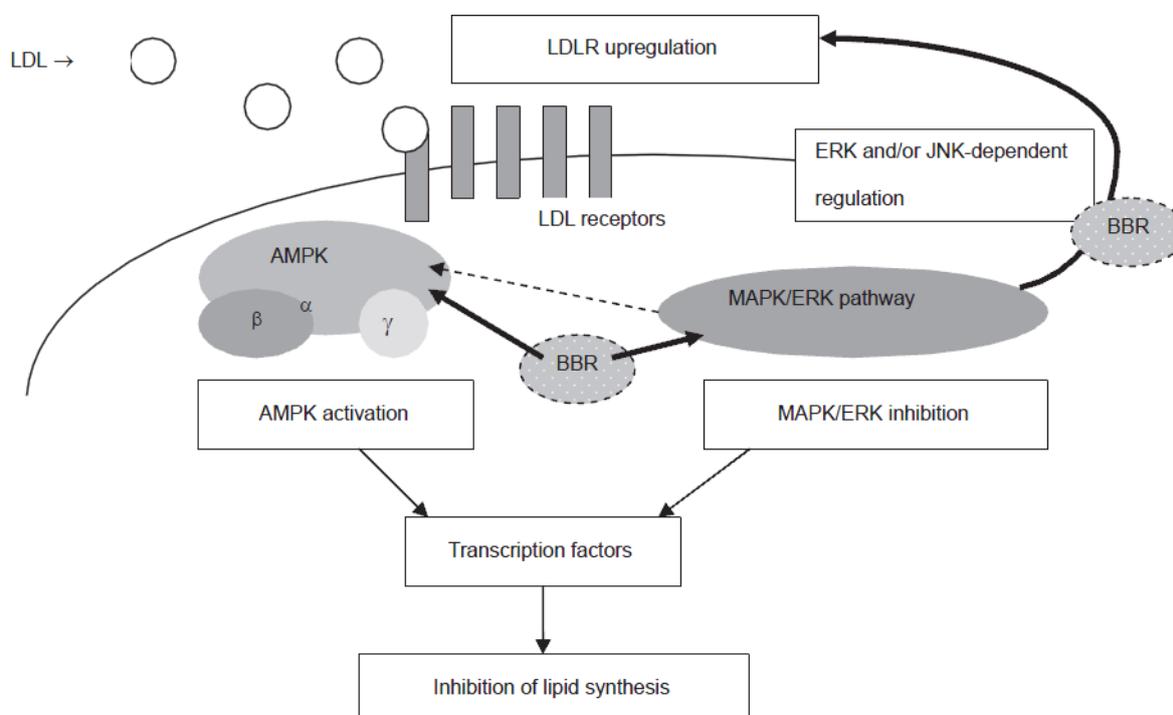
Figura 8: Estrutura molecular da berberina

A berberina é utilizada para o tratamento de inúmeras doenças, tendo vários efeitos farmacológicos. Foram anteriormente descritos efeitos antibacterianos, antitumorais, anti-inflamatórios, de redução dos níveis de glicose no sangue, (Yang, Yin et al. 2012), ao nível do metabolismo lipídico, na disfunção endotelial e ao nível cardiovascular (Tang, Wei et al. 2006; Affuso, Mercurio et al. 2010), na resistência à insulina (Brownlee 2005; Kong, Zhang et al. 2009; Liu, Cheung et al. 2010; Yang, Yin et al. 2012), na diabetes (Tang, Wei et al. 2006; Wang, Campbell et al. 2011) e na obesidade (Hu and Davies 2010; Yang, Yin et al. 2012).

### 1.5.1 Berberina e o metabolismo lipídico

Os efeitos da berberina no metabolismo dos lípidos tem vindo a ser estudados e sabe-se que a berberina diminui os níveis dos lípidos através do aumento de expressão do receptor hepático do colesterol associado às LDL (LDLR) pela regulação do sinal de uma cinase extracelular (ERK) e ainda por aumentar a actividade transcripcional do promotor LDL-R pela via da cinase do factor de transcrição c-Jun (JNK) (Tang, Wei et al. 2006; Kim, Lee et al. 2009; A.F. Cicero 2009 ; Hu and Davies 2010).

Para além do aumento da expressão do LDLR, a berberina activa a cinase de adenosina monofosfato (AMPK), enquanto que bloqueia a via da cinase das proteínas activadoras da mitogénese/ERK (MAPK/ERK), resultando na inibição da síntese lipídica (figura 9) (A.F. Cicero 2009 ).



**Figura 9: Acções moleculares da berberina no metabolismo dos lípidos. Adaptado (A.F. Cicero 2009 )**

A berberina actua no metabolismo dos lípidos inibindo a adipogénese durante a diferenciação dos pré-adipócitos. Este fármaco vai actuar sobre o colesterol total e triglicerídeos e ainda promove uma diminuição da ingestão de alimentos o que conduz a uma diminuição do peso corporal. Uma outra vantagem deste composto é o facto de não apresentar toxicidade para os animais, sendo segura a sua utilização (Hu and Davies 2010).

### **1.5.2 Berberina e os efeitos na resistência à insulina e na glicose**

Ao nível da célula  $\beta$ , a glicose é transportada para o interior da célula e aí é fosforilada pela enzima glucocinase a glicose-6-fosfato. A glucocinase regula a secreção de insulina estimulada pela glicose através da modulação da via glicolítica (Wang, Huang et al. 2009). A berberina vai actuar no modo de acção desta enzima, aumentando a sua actividade. Assim, como consequência é necessário mais absorção de glicose e um aumento da secreção de insulina. Logo, como resultado obtemos uma diminuição dos níveis de glicose no organismo.

Aparentemente a berberina não promove apenas um aumento da sensibilidade à insulina mas vai também interagir directamente com o pâncreas. Por outro lado, a berberina pode também actuar ao nível da homeostase da glicose. Alguns estudos sugerem que a berberina inibe a função mitocondrial através da inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, estimula a utilização periférica da glicose, activa a via da AMPK, reduz a adipogénese e induz a expressão de LDLR. Com todas estas acções a berberina promove uma melhoria acentuada ao nível da resistência à insulina e reduz a hiperglicemia, ambas associadas com a síndrome metabólica (Zhou, Yang et al. 2007; Yin, Gao et al. 2008; Wang, Huang et al. 2009; A.F. Cicero 2009 ; Zhang, Xiao et al. 2011; Yang, Yin et al. 2012).

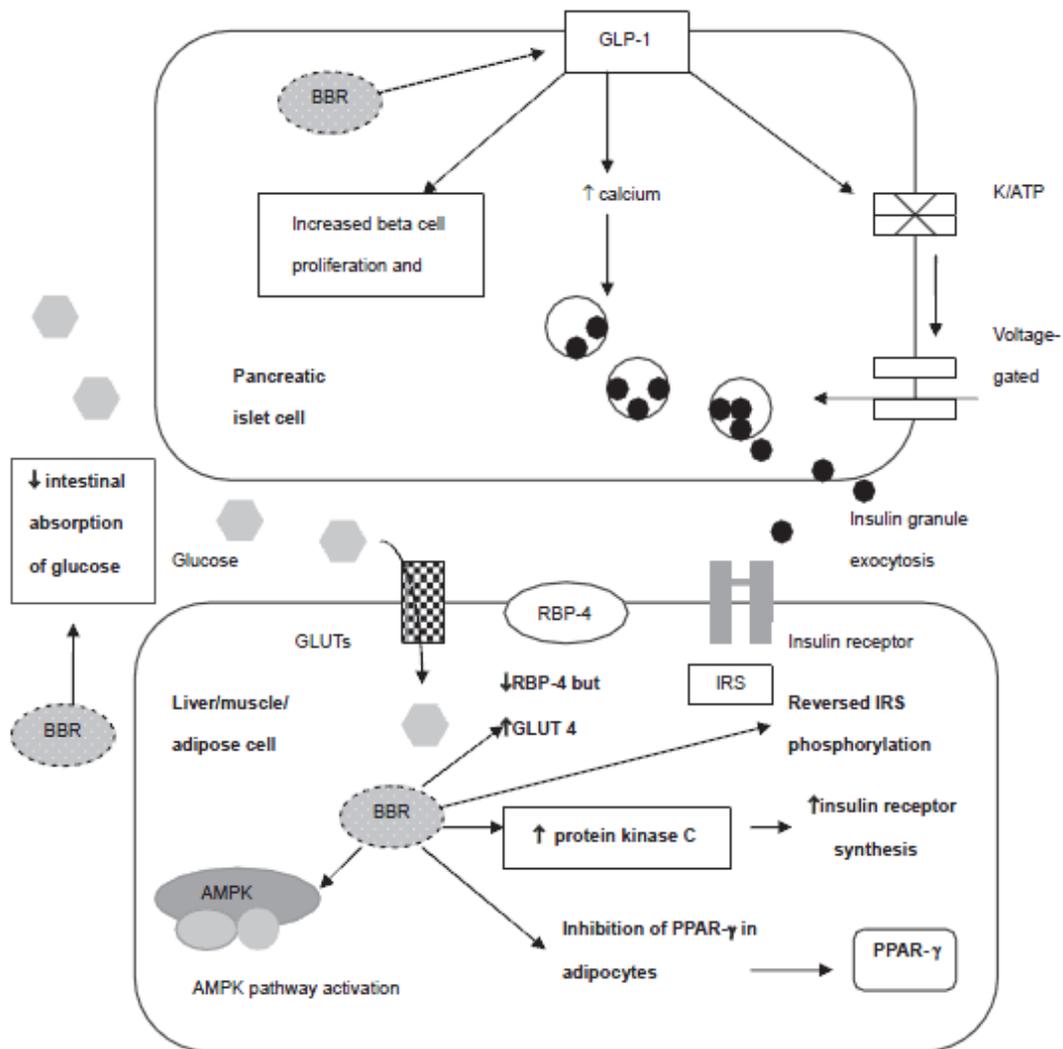


Figura 10: Efeito da berberina no metabolismo da glicose. Adaptado (A.F. Cicero 2009 )

### 1.5.3 Berberina e os efeitos vasculares

Os efeitos vasorelaxantes da berberina têm vindo a ser observados em vários modelos animais. É provável que a berberina actue ao nível do endotélio e das células do músculo liso. Os efeitos vasorelaxantes da berberina podem estar associados com o efeito inibitório da enzima de conversão da angiotensina uma (ACE) e a libertação directa de NO/cGMP na artéria aorta de ratos. Ao nível do músculo liso a sua acção antagónica nos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, à activação de canais de potássio e a inibição da libertação de cálcio intracelular, podem também contribuir para o relaxamento.

A berberina aumenta a expressão da eNOS e inibe a expressão da iNOS, no tecido gástrico de ratinho. No caso da aorta, uma exposição deste tecido à berberina atenua a contração induzida pela angiotensina e aumenta o NO e cGMP (A.F. Cicero 2009 ).

## **1.6 OBJECTIVOS**

Pretendemos com este projecto investigar os efeitos da berberina na disfunção endotelial de modelos animais com síndrome metabólica bem como caracterizar alguns dos principais mecanismos de acção associados.

Serão avaliados os benefícios terapêuticos da berberina em diferentes marcadores de *stress* oxidativo sistémicos e na parede das artérias e os níveis de expressão de diferentes proteínas. Avaliaremos o impacto da administração de berberina nos níveis de adiponectina, leptina e ácidos gordos livres em circulação (FFAs).

A síndrome metabólica será analisada num modelo animal de obesidade induzida com dieta (DIO) e insulino-resistente.

É esperado que, na presença deste composto seja prevenida a disfunção endotelial e substancialmente reduzida a insulino-resistência.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**



## 2.1 MATERIAIS

### 2.1.1 Reagentes químicos e imunológicos

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

**Tabela 1: Reagentes e produtos mais relevantes do trabalho**

AMPK total	Cell Signaling, USA
Anti-Actin monoclonal antibody	Chemicon International Company USA
Anti-CML monoclonal antibody	Trans Genic Inc, Japão
Anti-RAGE rabbit polyclonal antibody	Abcam, Reino Unido
Berberina	Sigma-Aldrich
Dieta 60 kcal % de gordura	Research diets, inc
Glicose 30%	Braun, Portugal
MCP-1	Merk-Millipore, USA
Phospho-AMPK	Cell Signaling, USA
Phospho-eNOS (Ser 1177) Antibody	Cell Signalling, USA
Phospho-Vasp (Ser 239) Antibody	Cell Signalling, USA
Purified Mouse Anti-eNOS/NOS Type III	BD Biosciences, USA
Secondary Anti-Mouse	GE Healthcare, RU
Secondary Anti-Rabbit	GE Healthcare, RU
VASP (9A2) Rabbit mAb	Cell Signalling, USA

## **2.2 MODELOS ANIMAIS E TRATAMENTOS**

Para o desenvolvimento deste estudo, recorreu-se a um modelo animal normal não obeso, os ratos machos Sprague-Dawley (SD) com 6 meses de idade. A estirpe foi adquirida comercialmente (Charles River, França) e foi mantida num ambiente ventilado, com ciclos de 12 horas de luz/ 12 horas de escuridão com temperatura (21-24°C) e humidade (50-60%) controlada.

Os animais foram divididos em quatro grupos de estudo: grupo controlo (SD); grupo controlo tratado com 100mg/Kg berberina, durante 4 semanas (SD+BBR); grupo de animais alimentados com uma dieta rica constituída por 60 Kcal % de gordura (Research diets, inc) (SDHFD) e ainda um grupo de animais alimentados com uma dieta rica em gordura e tratado com 100mg/Kg de berberina (SDHFD+BBR). A berberina foi administrada por via oral durante 4 semanas até ao dia do sacrifício.

Todos os animais tiveram livre acesso a ração e água durante o estudo. É necessário ressaltar que todos os procedimentos nos animais estiveram de acordo com a Lei Portuguesa para a experimentação de animais em laboratório.

### **2.2.1 Glicemia, hemoglobina A1c e Peso Corporal**

No final do período de terapêutica os animais dos diferentes grupos foram pesados e foi-lhes medida a glicemia e a hemoglobina A1c após um jejum de 16-18h. O sangue para ambos os testes foi recolhido da veia da cauda. A glicemia foi determinada pelo método da glicose-oxidase, recorrendo-se ao uso do glicómetro (Glucometer-Ellite-Bayer, Portugal S.A.) e tiras-teste compatíveis (Bayer, Portugal S.A.). Os níveis de glicose no sangue total foram expressos em mg/mL.

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

### **2.2.2 Colheita de sangue**

Para a determinação de parâmetros sanguíneos, o sangue total dos animais foi recolhido após um jejum de 16-18h. Os animais foram anestesiados, por via intramuscular, com cloridrato de quetamina (75 mg/Kg) e clorpromazina (3 mg/Kg) e o sangue foi recolhido

através de punção cardíaca quando o animal já se encontrava adormecido e completamente dessensibilizado.

Para avaliação de parâmetros séricos e plasmáticos o sangue foi centrifugado a 3500g durante 10 minutos a 4°C, sendo posteriormente o soro e o plasma aliqüotados e armazenados a -80°C até ao seu processamento.

### **2.2.3 Sacrifício dos animais e recolha dos órgãos**

Os animais foram anestesiados, como anteriormente referido e sacrificados por deslocamento cervical. Após a exposição dos órgãos intra-abdominais procedeu-se rapidamente à excisão da artéria aorta e retirou-se o tecido conjuntivo de forma a preservar o endotélio.

A artéria aorta foi dividida em 2 segmentos de aproximadamente 4mm de comprimento e a restante foi congelada em azoto líquido e armazenada a -80°C para posteriores análises. Um dos segmentos foi preservado numa matrix criopreservante para posteriores estudos histológicos e o outro segmento foi colocado numa solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl, 118,6; KCl, 4,7; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; MgSO<sub>4</sub>, 1,18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,18; Glicose 11,0; CaCl<sub>2</sub>, 1,6, o pH foi aferido a 7,4 e a solução esteve constantemente a ser gaseada (95% de O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Este segmento foi então montado num sistema a 37°C e com a tensão controlada para os estudos isométricos.

### **2.2.4 Estudos Isométricos**

Os segmentos de artéria aorta (4mm) foram montados em câmaras de órgãos individuais, num banho de órgãos com 5 mL de capacidade contendo a solução de Krebs-Henseleit com a composição anteriormente referida. A solução foi mantida a 37°C e oxigenada com uma mistura de gases de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Os anéis de aorta encontram-se ligados a um transdutor de força (PowerLab) no banho de órgãos e foram distendidos inicialmente a uma tensão de repouso de 1 g, estabelecida previamente como a tensão ideal, através de curvas de comprimento-tensão, durante 60 minutos.

Após o equilíbrio, as artérias aorta são contraídas com uma solução de fenilferina (Phe) 3 µM durante 10 minutos, de seguida avalia-se a resposta de relaxamento induzido pelo dador de óxido nítrico (NO), nitroprussiato de sódio (SNP, 10<sup>-9</sup> A 10<sup>-3</sup> M), com adições cumulativas em intervalos de 3 minutos. O SNP é um dador de NO e visa avaliar a vasodilatação independente do endotélio (Tabela 1).

De seguida, substitui-se a solução Krebs-Henseleit e contraem-se novamente as artérias com 3  $\mu\text{M}$  Phe durante 10 minutos seguindo-se adições cumulativas de acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M) (Tabela 2) em intervalos de 4 minutos, de forma a avaliar a vasodilatação dependente do endotélio.

Substitui-se novamente a solução das artérias por uma solução de Krebs-Henseleit com N<sup>w</sup>Nitro-L-Arginina (L-NAME 300  $\mu\text{M}$ ), um inibidor da produção de NO, nos poços individuais no banho de órgãos e após incubação por 15 minutos, contraem-se as artérias e avalia-se a resposta das artérias à acetilcolina,  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M.

As respostas de relaxamento da ACh e do SNP foram expressas em percentagem de relaxamento a partir de um submáximo obtido através da contração induzida pela Phe 3  $\mu\text{M}$ . Os valores de EC<sub>50</sub> foram determinados através de uma equação obtida a partir da análise de regressão da curva dose-resposta.

**Tabela 2: Curva dose-resposta ao SNP**

<b>Sequência de adição</b>	<b>Concentração final</b>
<b>SNP1</b>	1 nM
<b>SNP2</b>	10 nM
<b>SNP3</b>	100 nM
<b>SNP4</b>	1 $\mu\text{M}$
<b>SNP5</b>	10 $\mu\text{M}$
<b>SNP6</b>	100 $\mu\text{M}$
<b>SNP7</b>	200 $\mu\text{M}$

Tabela 3: Curva dose-resposta à ACh

<b>Sequência de adição</b>	<b>Concentração final</b>
<b>ACh1</b>	1 nM
<b>ACh2</b>	10 nM
<b>ACh3</b>	100 nM
<b>ACh4</b>	1 $\mu$ M
<b>ACh5</b>	10 $\mu$ M
<b>ACh6</b>	100 $\mu$ M
<b>ACh7</b>	1 mM

### **2.2.5 Determinação dos níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos**

Os níveis séricos dos parâmetros lipídicos colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos foram obtidos por analisador automático e expressos em mg/dL.

### **2.2.6 Determinação dos níveis de leptina, adiponectina e insulina**

A leptina e a adiponectina foram quantificados no soro dos animais através de kit de ELISA (Rat leptin ELISA kit e Rat Adiponectin ELISA kit, Invitrogen). As insulinemias foram determinadas no plasma dos animais através de um kit de ELISA (Ultrasensitive Rat Insulin ELISA, Mercodia).

### **2.2.7 Determinação dos níveis de ácidos gordos livres**

Os ácidos gordos livres foram determinados no plasma dos animais por espectrofotometria utilizando um kit comercial (Half-Micro test, Roche Applied Science).

### 2.2.8 Homogeneizados da artéria aorta

Os segmentos de artéria aorta, macerados e colocados em tampão de lise com a seguinte constituição (em mM, pH 7.4): Tris-HCl 50; cloreto de sódio (NaCl) 150; EDTA 1; SDS 0,1%; desoxicolato de sódio 0,5%; Triton X-100 1%; Fluoreto de Sódio (NaF) 5; orto-vanadato de sódio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 1;  $\beta$ -glicerofosfato 2; pirofosfato de sódio 2;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%; PMSF 1; cocktail de inibidores de protease 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , constituído por aprotinina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , leupeptina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e pepstanina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Em seguida, as amostras foram sonicadas a 4°C e centrifugadas (10min, 10000g, 4°C). Recolheu-se o sobrenadante e procedeu-se à determinação da concentração de proteína pelo método do BCA. Por último, adicionou-se sample buffer 6 vezes (Tabela 4) concentrado a cada amostra com base no volume de sobrenadante obtido após a centrifugação. No final as amostras foram armazenadas a -80°C até à sua utilização.

### 2.2.9 Determinação da proteína pelo método do BCA

O kit BCA Protein Assay (Pierce Protein research, Rockford, EUA) baseia-se num método espectrofotométrico para a determinação da quantidade de proteína no tecido homogeneizado. Para o cálculo da concentração construiu-se uma curva de calibração com albumina de soro bovino (BSA) numa concentração conhecida. A concentração das amostras foi expressa em mg/mL..

### 2.2.10 Determinação dos níveis de expressão de proteínas por Western Blotting

A identificação e quantificação dos níveis de expressão de eNOS total, eNOS fosforilada, VASP total, VASP fosforilada, CML, RAGE, AMPK total e AMPK fosforilada efectuaram-se por Western Blot.

Uma das formas de analisar as proteínas de uma amostra, é através da separação num gel de poli-acrilamida desnaturante contendo SDS, vulgarmente conhecida como SDS-PAGE. Neste tipo de separação, o principal cuidado a ter é escolher um anticorpo que reconheça as proteínas desnaturadas (Harlow e Lane, 1999).

Antes da aplicação no gel, as proteínas são desnaturadas pela acção do calor e pelo SDS presente no tampão de amostra. O SDS liga-se fortemente às proteínas conferindo-lhes carga negativa e, conseqüentemente, quando sujeitas à acção do campo eléctrico,

migram para o cátodo. Também está presente no tampão de amostra um reagente tiólico, usualmente o  $\beta$ -mercaptoetanol ou o DTT (*dithiothreitol*) que é usado para reduzir as ligações persulfureto. O tampão de amostra também possui glicerol que é utilizado para aumentar a densidade da amostra e assim mantê-la no fundo do poço aquando da aplicação no gel. Para visualizar a migração das proteínas é aplicado a este tampão um corante, geralmente o azul de bromofenol que, sendo aniónico e pequeno, irá migrar mais rapidamente do que qualquer componente da mistura a separar, originando assim uma frente de migração que permite monitorizar todo o processo de separação (Wilson e Walker, 2005).

Os géis de poli(acrilamida) são muito usados em electroforese de proteínas, pois apresentam uma elevada resolução, originando uma boa separação dos componentes da amostra em estudo, que depende também do tamanho dos poros causados pela estrutura do gel. Estes géis são preparados através da polimerização do radical livre acrilamida com o agente de ligações cruzadas N,N'-metileno-bisacrilamida. A reacção de polimerização é iniciada pelo agente iniciador persulfato de amónio e pelo catalisador TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine). Os géis são, assim, redes tridimensionais de cadeias de hidrocarbonetos ligadas por grupos metilenos (Wilson e Walker, 2005).

Neste trabalho, a electroforese foi realizada por um sistema vertical descontínuo, em que o tampão utilizado na preparação dos géis é diferente daquele que é usado no reservatório de electroforese. Este tipo de sistema é composto por dois géis de composição distinta (concentração de acrilamida, pH e força iónica) mas contíguos. O primeiro gel é um gel com poros largos que fica na parte superior do sistema e é um gel de concentração. O segundo, fica na parte inferior, é um gel resolvente que permite a separação das amostras, tendo assim poros mais apertados. A diferença que existe nos valores de pH entre os dois géis é importante, pois é através dessa diferença que ocorre a concentração da amostra no gel de concentração, o que faz com que seja possível usar volumes maiores de amostra num sistema descontínuo do que num sistema contínuo (Wilson e Walker, 2005). O valor da concentração de acrilamida na mistura de polimerização determina o tamanho dos poros do gel, diminuindo o tamanho do poro à medida que a concentração de acrilamida aumenta. Assim, a escolha do valor de concentração de acrilamida é muito importante para se obter uma boa separação da amostra (Wilson e Walker, 2005).

Após a separação das proteínas, ocorre a transferência destas sob a acção de um campo eléctrico, para uma membrana, neste caso de PVDF, que será uma réplica exacta da separação que ocorreu no gel. É então esta membrana, que contém as proteínas aí imobilizadas, que vai ser incubada com os anticorpos específicos, o que vai permitir a identificação e a posterior quantificação das proteínas em estudo (Harlow e Lane, 1999).

O processo de detecção de uma proteína numa membrana é composto essencialmente por três fases: a) bloqueio da membrana, b) ligação ao anticorpo e c) visualização do sinal. Uma vez que as membranas utilizadas na técnica de *Western Blot* têm uma elevada afinidade para proteínas, é necessário bloquear as membranas com uma solução rica em proteínas como, por exemplo, leite magro, de modo a evitar a adsorção inespecífica entre o anticorpo e a membrana (Harlow e Lane, 1999). Após o bloqueio é feita a incubação da membrana com o anticorpo primário, que é específico para a proteína (antígeno) em estudo, e com o anticorpo secundário que, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. O anticorpo secundário está conjugado com uma molécula que facilita a sua identificação, neste caso a fosfatase alcalina. Deste modo, a proteína de interesse pode ser detectada através de uma reacção catalisada pelo enzima.

Os géis foram polimerizados utilizando-se dois tampões diferentes, tampão resolvente e tampão concentração (tabela 4). As amostras foram fervidas durante 5 minutos e colocadas nos géis polimerizados. A corrida do gel efetuou-se em tampão Running (tabela 4). As amostras foram dispostas nos géis de acordo com a ordem desejada e utilizou-se um padrão para identificação dos pesos moleculares (Precision Plus Standard, Dual Color, Bio-Rad, EUA). A corrida foi feita a uma voltagem de 150 V constantes durante 1h30minutos.

Após a corrida do gel, colocaram-se os géis em contacto direto com a membrana de PVDF (Polyvinylidene Flouride Membrane, Bio-Rad, EUA), previamente ativadas. O sistema de transferência foi montado e a transferência ocorreu em tampão CAPS (tabela 4), a amperagem constante (200mA). Concluída a transferência as membranas foram bloqueadas em solução de TBS-T-BSA 5%, no caso de proteínas fosforiladas e TBS-T-Leite 10% no caso de proteínas totais, à temperatura ambiente durante 2h.

Finalizado o bloqueio as membranas foram incubadas com o anticorpo primário durante a noite a 4°C com agitação constante. No dia seguinte, efetuaram-se as lavagens em TBS-T, e incubação com o anticorpo secundário, 1h à temperatura ambiente e novas lavagens. Nos final das lavagens as membranas foram incubadas com substracto enzimático (Rabbit ECF Wertern Blotting Reagent, Amersham Biosciences, Carnaxide, Portugal) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

Tabela 4: Soluções utilizadas na técnica de Western Blot

Soluções	Composição
Tampão Resolvente	0,75M Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 8,8
Tampão de concentração	0,25M Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 6,8
<i>Sample Buffer (6x)</i>	62,5mM Tris-HCl; 20% SDS a 10%; 25% glicerol; 2% Bromofenol azul; pH 6,8
Tampão de corrida	125mM Tris; 480mM Glicina; 9mM SDS; pH 8,8
Tampão CAPS	50mM CAPS, 10% metanol; pH 11
Tampão TBS	250mM Tris; 1,5mM NaCl; pH 7,6
Tampão TBS-T	Solução de TBS + 1% Tween 20

### 2.2.11 Stress oxidativo – Sonda di-hidroetídio (DHE)

Di-hidroetídio (DHE) é uma sonda lipofílica que permeia facilmente as células e é rapidamente oxidada a brometo de etídio na presença do radical livre superóxido. A produção de brometo de etídio (produto fluorescente no vermelho) é fixada por intercalação no ADN dando-nos a indicação da presença de *stress* oxidativo (Elmarakby, Loomis et al. 2005; Sena, Matafome et al. 2011).

Secções de aorta com cerca de 10 µm de espessura foram incubadas com DHE 2µM, em PBS durante 30 minutos, a 37°C, em ambiente húmido e protegidos da luz. Para a detecção do brometo de etídio, as imagens foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência (Leica DMIRE200, Wetzlar, Alemanha).

### 2.2.12 Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados foram todos apresentados como média ± erro padrão da média (e.p.m.) do número de experiências (n). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância simples (ANOVA I) para um intervalo de confiança de 95%.



### **3. RESULTADOS**



### 3.1 PESO CORPORAL, GLICEMIA E HEMOGLOBINA A1C

Quando se está a avaliar o efeito de uma ingestão exagerada de lípidos e calorias é crucial o controlo do peso dos animais. Num estudo em que estamos a avaliar o agravamento da síndrome metabólica em animais obesos também é muito importante a monitorização da glicemia em jejum e da hemoglobina A1c, um indicador do perfil glicémico dos animais nos últimos 3 meses.

O grupo de animais alimentado com uma dieta gorda apresentou, como seria de esperar, um aumento significativo do peso corporal quando comparado com o grupo controlo SD mantido com dieta standard ( $p < 0,01$ ) (tabela 5). Relativamente ao grupo obeso tratado com berberina (SDHFD+BBR), verificámos que houve uma diminuição significativa, cerca de 20% do peso corporal quando comparado com o grupo SD ( $p < 0,01$ ) e cerca de 40% quando comparado com o grupo SDHFD ( $p < 0,001$ ).

No que diz respeito à glicemia em jejum, verificou-se um aumento significativo da glicemia em jejum nos animais com dieta gorda, ( $p < 0,05$ ) quando comparados com os animais controlo. Relativamente aos valores do grupo SDHFD+BBR verificamos uma diminuição significativa deste parâmetro relativamente aos grupos SD ( $p < 0,05$ ), SD+BBR ( $p < 0,05$ ) e ao grupo SDHFD ( $p < 0,01$ ).

A hemoglobina A1c apresentou um aumento significativo nos animais alimentados com dieta gorda relativamente aos animais SD ( $p < 0,01$ ). Nos grupos de animais tratados com berberina, tanto os SD ( $p < 0,001$ ) como os SDHFD+BBR ( $p > 0,05$ ) observámos uma diminuição significativa deste parâmetro relativamente ao grupo de animais obesos.

Tabela 5: Peso corporal, glicemia do jejum e hemoglobina A1c nos diferentes grupos em estudo;

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  relativamente ao grupo SD;  $^{\S}p < 0,05$ ,  $^{\S\S}p < 0,01$ ,  $^{\S\S\S}p < 0,001$  relativamente ao grupo SD+BBR;  $^{\Phi}p < 0,05$ ,  $^{\Phi\Phi}p < 0,01$ ,  $^{\Phi\Phi\Phi}p < 0,001$  relativamente ao grupo SDHFD

	SD (n=9)	SD+BBR (n=9)	SDHFD (n=9)	SDHFD+BBR (n=6-7)
<b>Peso corporal (g)</b>	643,2±21,16	558±13,07	777,73±31,63 <sup>**§§§</sup>	538,5±18,55 <sup>*ΦΦΦ</sup>
<b>Glicemia jejum (mg/dL)</b>	75,2±1,41	74,4±1,39	80,45±3,17 <sup>*</sup>	63,14±4,36 <sup>*§ΦΦ</sup>
<b>HbA1c (%)</b>	3,25±0,05	3,23±0,04 <sup>ΦΦΦ</sup>	3,53±0,06 <sup>**</sup>	3,3±0,04 <sup>Φ</sup>

### 3.2 PERFIL LIPÍDICO DOS ANIMAIS: NÍVEIS SÉRICOS DE COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL NÃO HDL, TRIGLICERÍDEOS E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ÁCIDOS GORDOS LIVRES

Neste estudo é de extrema importância a avaliação dos parâmetros lipídicos nos diferentes grupos em estudo, dado tratar-se de um modelo animal com síndrome metabólica induzida pela dieta. Para tal, avaliou-se o nível de colesterol total presente no soro dos animais. Observou-se um aumento significativo dos níveis de colesterol nos animais obesos ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo controlo e verificámos ainda uma diminuição significativa dos níveis de colesterol total no grupo de animais obesos tratados com berberina relativamente, tanto ao grupo controlo SD ( $p > 0,05$ ) como ao grupo SDHFD ( $p > 0,05$ ), tal como podemos observar na tabela 6.

A administração da berberina aos animais obesos promoveu alterações nos níveis de colesterol não-HDL e triglicerídeos. Relativamente aos níveis do colesterol não-HDL, como podemos observar na tabela 5 houve uma tendência de diminuição que não é estatisticamente significativa. No que diz respeito aos triglicerídeos, há um aumento dos mesmos no grupo de animais obesos, mas esta diferença não é significativa. Em relação ao grupo de animais SDHFD tratados com berberina, há uma diminuição muito significativa dos níveis de triglicerídeos ( $p < 0,01$ ) relativamente aos animais obesos.

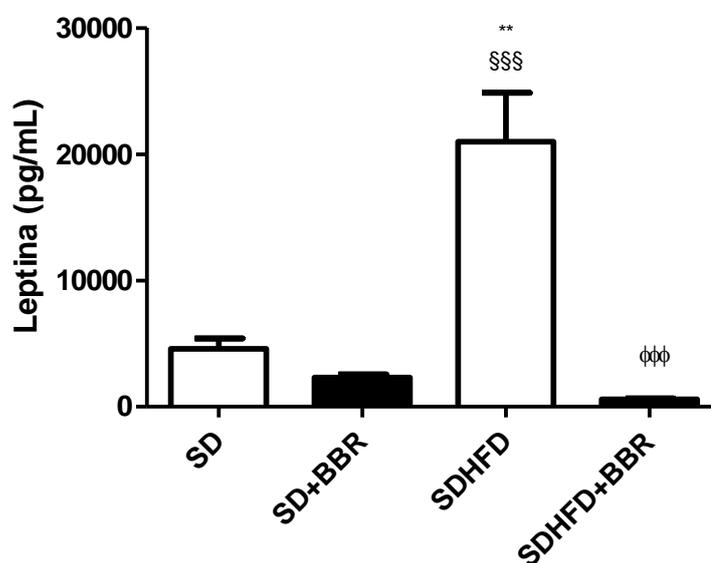
**Tabela 6:** Níveis séricos de colesterol total, colesterol não-HDL, triglicerídeos e níveis plasmáticos de ácidos gordos livres; \* $p < 0,05$  relativamente ao grupo SD; <sup>§§</sup> $p < 0,01$  relativamente ao grupo SD+BBR; <sup>φ</sup> $p < 0,05$  relativamente ao grupo SDHFD

	SD (n=9)	SD+BBR (n=9)	SDHFD (n=9)	SDHFD+BBR (n=6)
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	76±4,85	77,75±4,37	95,11±5,68*	68±4,4 <sup>*φ</sup>
<b>Colesterol não-HDL (mg/dL)</b>	29,65±1,74	30,5±2,37	32,75±2,53	28,67±4,54
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	86,93±9,95	96,5±11,2	94,89±9,66	44,33±5,75 <sup>*φ§§</sup>

### 3.3 NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA E ADIPONECTINA

Foram determinados os níveis séricos das hormonas do tecido adiposo leptina e adiponectina uma vez que está descrito que estas hormonas são cruciais na regulação do peso corporal e adiposidade. Na figura 11 A estão representados os níveis de leptina em circulação no soro dos animais em estudo e é possível observar que, como seria de esperar, os animais obesos (SDHFD) apresentam um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) relativamente aos animais controlo (SD). A berberina promoveu uma diminuição significativa destes valores. Os níveis de leptina nos animais SDHFD+BBR desceram 98% ( $p < 0,001$ ) quando comparamos com o grupo SDHFD e 19% quando comparamos com o grupo de animais SD ( $p < 0,001$ ).

Relativamente aos níveis de adiponectina figura 11 B, é possível verificar que houve um pequeno aumento dos níveis de adiponectina, no grupo de animais SDHFD ( $p < 0,05$ ) relativamente aos animais SD. Em relação aos grupos de animais tratados com berberina, este alcaloide promoveu um aumento significativo da concentração de adiponectina nos animais SDHFD+BBR ( $p < 0,01$ ) relativamente aos animais SDHFD e ainda relativamente ao grupo de animais controlo ( $p < 0,001$ ).

**A**

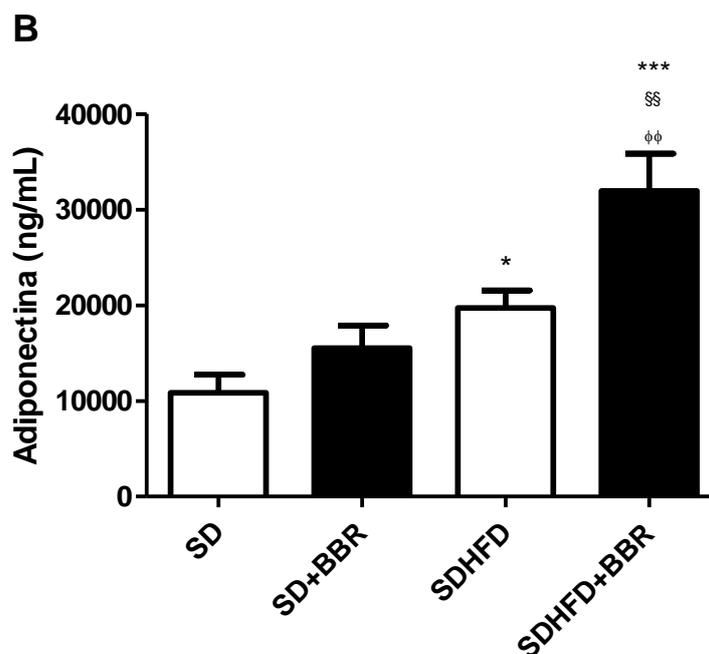


Figura 11: Níveis séricos de leptina (painel A) e adiponectina (painel B)

Na figura está representada a ação da berberina nos níveis de leptina e adiponectina em animais normais e obesos com e sem administração de berberina. Os resultados estão representados como média± e.p.m. (n=7-12)

\* $p < 0,05$  em comparação com o grupo SD

§§§  $p < 0,001$  em comparação com o grupo SDBBR

φφφ  $p < 0,001$  em comparação com o grupo SDHFD

### 3.4 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE INSULINA

A obesidade surge normalmente associada ao aumento da resistência à insulina. É por isso muito importante avaliar os níveis de insulina e a resistência à insulina neste estudo. Na figura 12 A podemos observar que houve uma tendência de aumento dos níveis plasmáticos de insulina nos animais obesos quando comparados com os animais controle, (embora esta diferença não seja estatisticamente significativa). No caso dos animais obesos que foram sujeitos ao tratamento com a berberina é possível observar uma tendência de diminuição dos níveis plasmáticos de insulina ( $p > 0,05$ ).

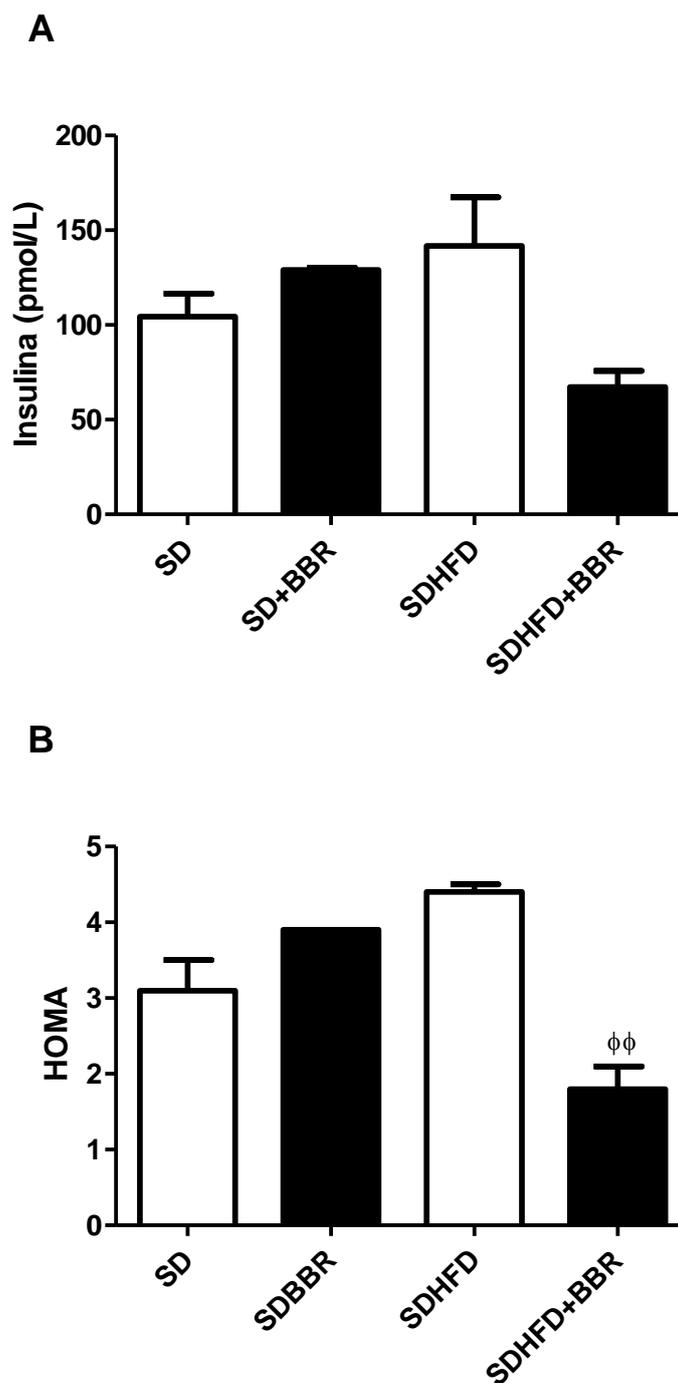


Figura 12: Efeitos da berberina na insulinemia (painel A) e na resistência à insulina (painel B)

(A) Níveis de insulina plasmática dos animais em estudo. (B) Níveis de insulino-resistência dos animais em estudo;

Os resultados estão representados como média± e.p.m. (n=4-9)

<sup>φφ</sup>p<0,01 relativamente ao grupo SDHFD

A fim de compreendermos melhor os efeitos da berberina na síndrome metabólica calculou-se o índice de insulino-resistência HOMA e verificámos que nos animais obesos há

uma tendência de aumento deste índice relativamente ao grupo SD. A administração da berberina diminui significativamente ( $p < 0,01$ ) o índice de insulino-resistência (figura 12 B).

### 3.5 NÍVEIS DE GLICAÇÃO: CML E RAGE

Uma vez que está descrito que a obesidade é um importante factor para o aumento da formação e acumulação dos níveis de AGEs nos vasos sanguíneos, foram avaliados os níveis de CML e de RAGE, um importante AGE e o seu respetivo receptor. Estes parâmetros foram avaliados por Western Blot e os resultados obtidos foram quantificados através da análise densitométrica das respectivas bandas. Os níveis de CML e RAGE foram determinados na aorta e é possível observar através da análise da figura que os níveis de CML não tiveram diferenças significativas neste estudo (figura 13).

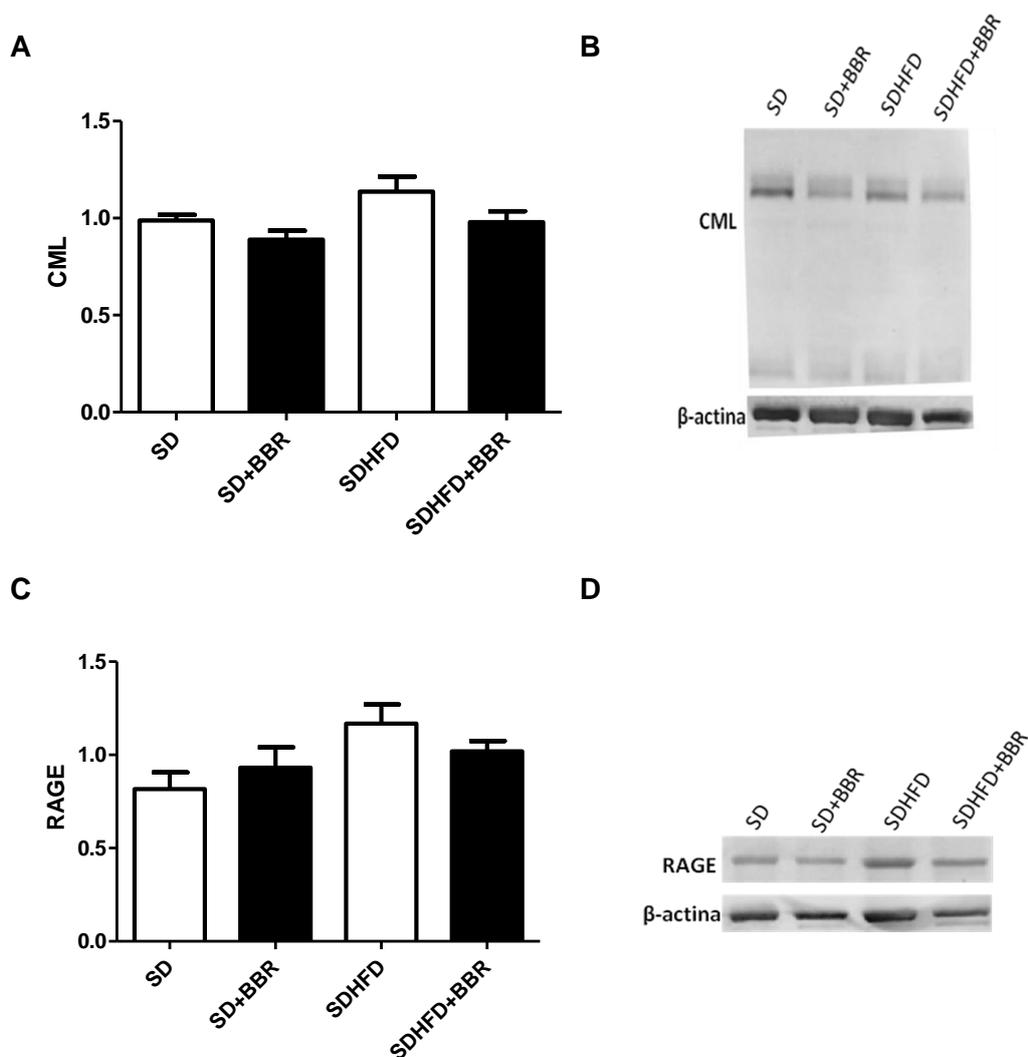


Figura 13: Efeitos da berberina nos níveis de expressão de CML e RAGE na aorta

(A) Níveis de expressão de CML na aorta nos diferentes grupos em estudo (B) Western blot representativo da expressão de CML em 10µg de proteína de homogeneizados de aorta dos diferentes grupos (C) Níveis de expressão de RAGE nos diferentes grupos (D) Western blot representativo da expressão de RAGE em 10µg de proteína de homogeneizados de aorta dos diferentes grupos. A densitometria das bandas dos diferentes grupos foi normalizada para a respectiva banda de β-actina.

### 3.6 RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

A avaliação da vasodilatação dependente do endotélio, ou seja, dependente da produção de NO, foi estudada através da adição de acetilcolina à artéria aorta que foi previamente contraída com fenilefrina. Na tabela 7 estão os valores de relaxamento máximo da artéria aorta em resposta à acetilcolina onde é possível verificar que o grupo SD apresenta um relaxamento máximo de cerca de 96%. O grupo SDHFD apresenta uma diminuição de 38% desse relaxamento ( $p < 0,001$ ) relativamente ao grupo controlo, tendo também um aumento do  $EC_{50}$  ( $p < 0,05$ ) (figura 14 A, tabela 7). A administração da berberina melhorou significativamente o relaxamento dependente do endotélio no grupo SDHFD+BBR quando comparado com o grupo SDHFD ( $p < 0,001$ ). É possível ainda verificar que a administração da berberina diminuiu o valor de  $EC_{50}$ , ou seja, melhorou a sensibilidade de resposta à ACh.

Tabela 7: Percentagem de relaxamento máximo e  $-\log EC_{50}$  em segmentos isolados da artéria aorta em resposta à acetilcolina nos diferentes grupos de animais em estudo. Os resultados são apresentados como média±e.p.m. (n=10-12); \* $p < 0,05$  em comparação com o grupo SD; <sup>§</sup> $p < 0,05$ ; <sup>§§</sup> $p < 0,01$ ; <sup>§§§</sup>  $p < 0,001$  em comparação com o grupo SDBBR; <sup>φφφ</sup> $p < 0,001$  em comparação com o grupo SDHFD

		SD	SD+BBR	SDHFD	SDHFD+BBR
ACh	pEC <sub>50</sub>	5,201±0,2	5,725±0,18	4,94±0,21 <sup>§</sup>	6,12±0,157 <sup>*§§</sup>
	Relaxamento Máximo (%)	96%±2,1	99%±1,42	62±2,01 <sup>***§§§</sup>	98%±1,3 <sup>φφφ</sup>

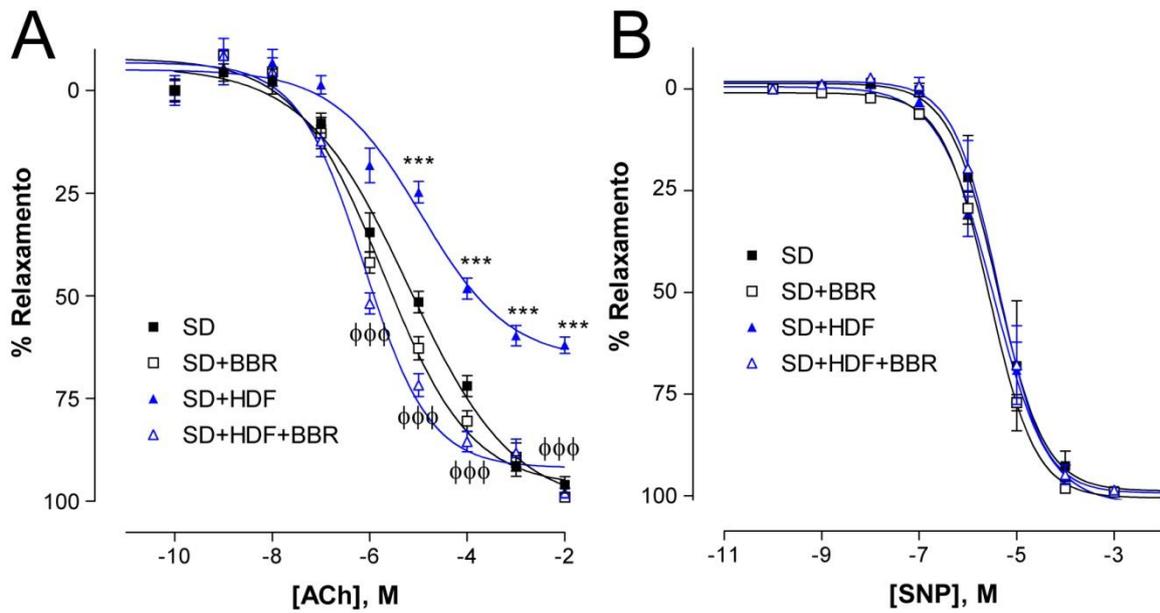


Figura 14: Curva dose-resposta à acetilcolina (A) e ao SNP (B)

Os resultados são apresentados como média±e.p.m. (n=10-12); \*p<0,05 em comparação com o grupo SD; <sup>§</sup>p<0,05; <sup>§§</sup>p<0,01; <sup>§§§</sup>p<0,001 em comparação com o grupo SDBBR; <sup>φφφ</sup>p<0,001 em comparação com o grupo SDHFD

No que diz respeito ao relaxamento independente do endotélio, ou seja, os efeitos do dador de NO na artéria aorta (figura 14 B), houve um relaxamento praticamente de 100% das artérias, não havendo quaisquer diferenças entre os grupos.

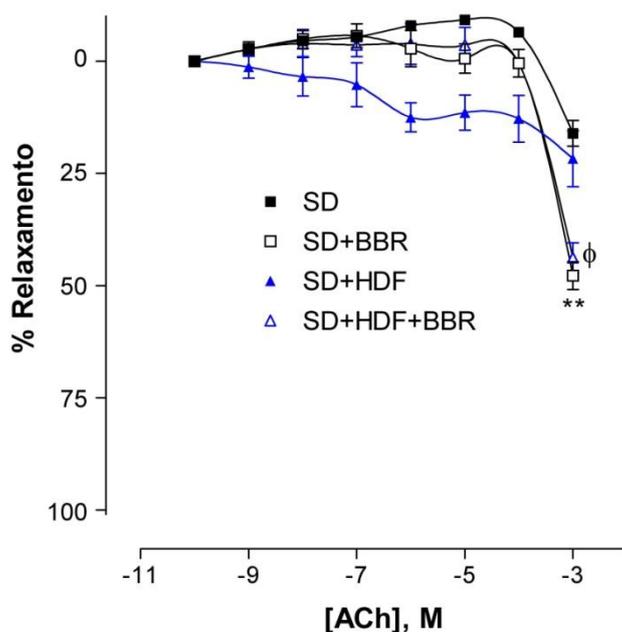


Figura 15: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME

Os resultados são apresentados como média±e.p.m. (n=10-12); \*p<0,05 em comparação com o grupo SD; §p<0,05; §§p<0,01; §§§ p<0,001 em comparação com o grupo SDBBR; φφφp<0,001 em comparação com o grupo SDHFD

Nos segmentos da aorta previamente incubadas com um inibidor da eNOS, L-NAME, observou-se um relaxamento significativo nos animais SD+BBR (p<0,01) quando comparados com os SD e nos animais SDHFD+BBR (p<0,05) quando comparados com os SDHFD, para a maior concentração de ACh testado, sugerindo que o relaxamento que está a ocorrer poderá ser independente do endotélio (figura 15).

### 3.7 MARCADORES DE DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: eNOS E VASP

Com vista a compreender os efeitos da berberina na disfunção endotelial, fomos determinar os níveis de expressão da eNOS e da VASP na aorta, através de Western Blot para avaliar os níveis de biodisponibilidade do NO.

Os níveis de eNOS activa foram determinados através do rácio eNOS fosforilada/eNOS total. Desta forma, podemos quantificar a produção de NO pela eNOS. Relativamente aos níveis da eNOS verificou-se que não houve diferenças significativas entre os grupos em estudo. Os níveis de eNOS nos animais SDHFD+BBR têm uma tendência para aumentar relativamente ao grupo de animais controlo (SD) (figura 16).

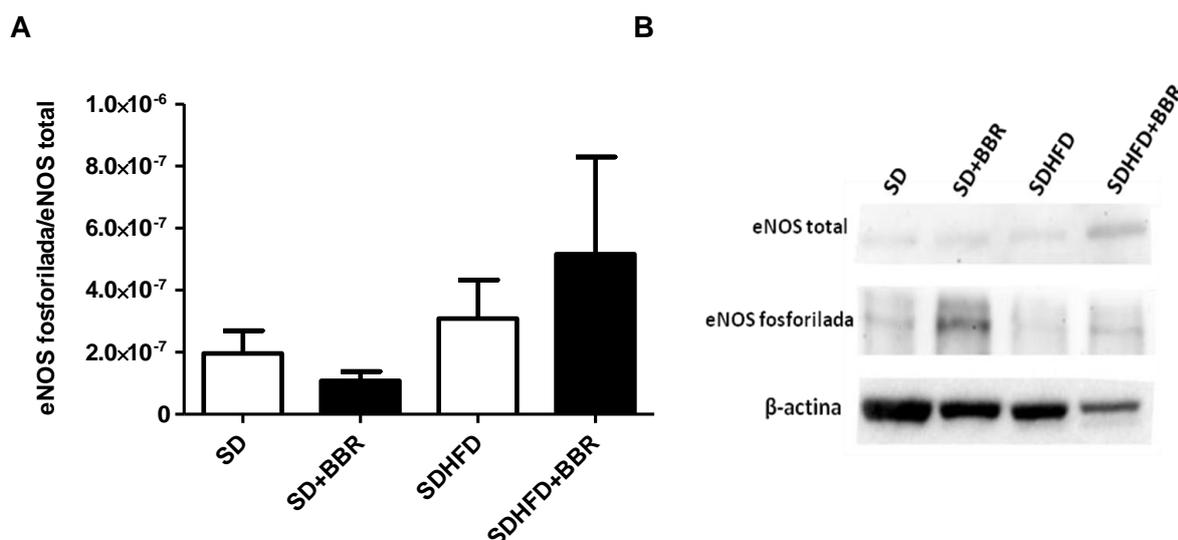


Figura 16: Efeitos da berberina nos níveis de eNOS na aorta.

(A) Níveis de expressão da enzima eNOS fosforilada/eNOS total nos diferentes grupos em estudo. (B) Western blot representativo dos níveis da expressão da enzima eNOS total e fosforilada em 10 $\mu$ g de proteína de homogeneizados de aorta nos diferentes grupos de animais em estudo.

Foram ainda analisados os níveis de expressão da VASP, também através do rácio de VASP fosforilada pela VASP total e assim quantificar a biodisponibilidade de NO. Os níveis de VASP não tiveram diferenças nos grupos de estudo, embora ocorra uma tendência para aumentar nos animais SD+BBR e nos animais SDHFD+BBR (esta diferença não foi significativa) (figura 15).

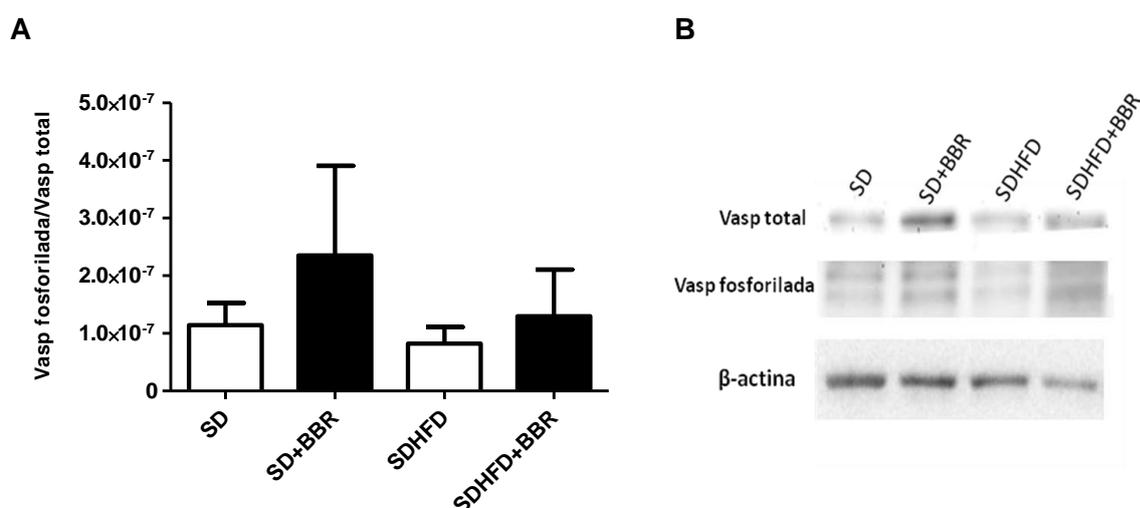


Figura 17: Efeitos da berberina nos níveis de VASP na aorta.

(A) Níveis de expressão da VASP fosforilada/VASP total dos diferentes grupos em estudo. (B) Western blot representativo dos níveis da expressão da VASP total e fosforilada em 10µg de proteína de homogeneizados de aorta nos diferentes grupos de animais em estudo.

### 3.8 STRESS OXIDATIVO: Sonda DHE

O anião superóxido é o principal oxidante do NO um dos responsáveis pela diminuição da sua biodisponibilidade na obesidade e na síndrome metabólica. Assim, fomos verificar se realmente teríamos níveis aumentados de anião superóxido na artéria aorta dos animais obesos e se a berberina tinha algum efeito antioxidante. Para tal, recorreu-se a uma técnica de fluorescência para determinar se há ou não aumento dos níveis de anião superóxido. Como é possível observar através da análise da figura há um aumento da fluorescência na aorta de SDHFD quando comparado com o grupo SD e a administração de berberina diminuiu a produção de anião superóxido nos animais SDHFD+BBR (figura 18).

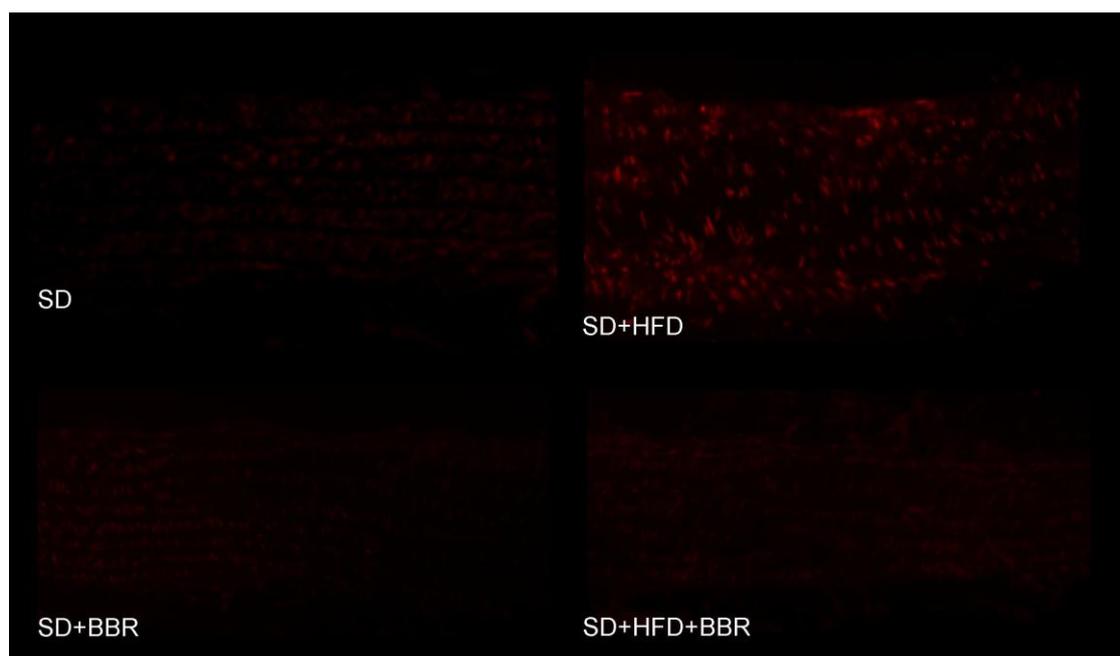


Figura 18: Detecção *in situ* do anião superóxido na artéria aorta nos diferentes grupos de animais em estudo.

### 3.9 PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS: NÍVEIS DE MCP-1

Fomos também avaliar os níveis de inflamação ao nível da artéria aorta, para tal foram determinados os níveis de expressão do MCP-1 neste tecido. Através da análise da figura 19 é possível observar que este parâmetro inflamatório apresenta uma tendência para aumentar no grupo de animais obesos (SDHFD) relativamente ao grupo controlo e que a administração da berberina promove uma tendência para diminuir os níveis inflamatórios no grupo de animais SDHFD+BBR, apesar destas diferenças não serem significativas.

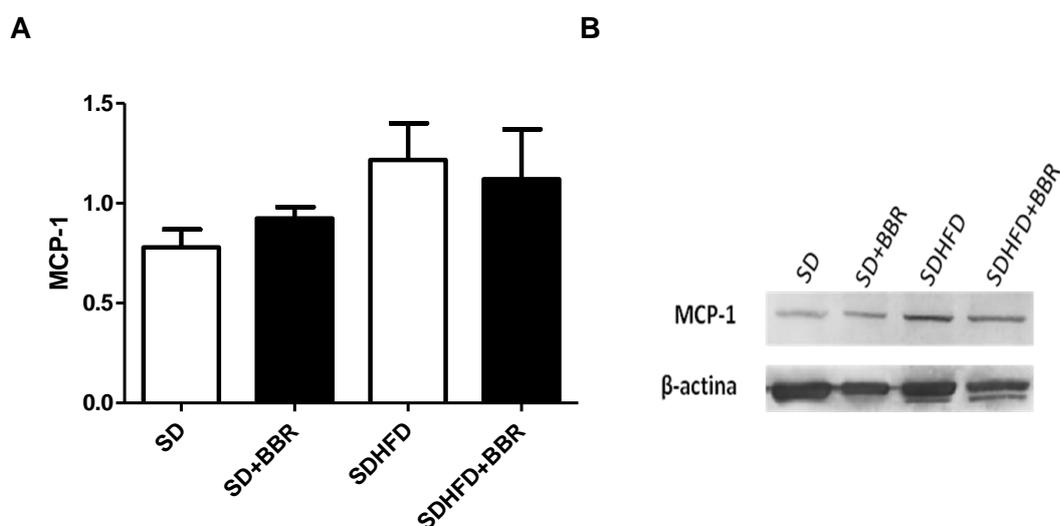


Figura 19: Efeitos da berberina nos níveis de expressão do MCP-1 na aorta

(A) Níveis de expressão do MCP-1 nos diferentes grupos em estudo. (B) Western blot representativo dos níveis da expressão da enzima MCP-1 em 10 $\mu$ g de proteína de homogeneizados de aorta nos diferentes grupos de animais em estudo.

### 3.10 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA AMPK

Uma vez que um dos efeitos descritos para a berberina ao nível metabólico é a activação da via da AMPK fomos averiguar os níveis de expressão desta proteína na aorta. Através da análise da figura podemos verificar que efectivamente a AMPK tem uma tendência para aumentar nos grupos de animais que foram tratados com berberina, no entanto esta diferença não é significativa (figura 20).

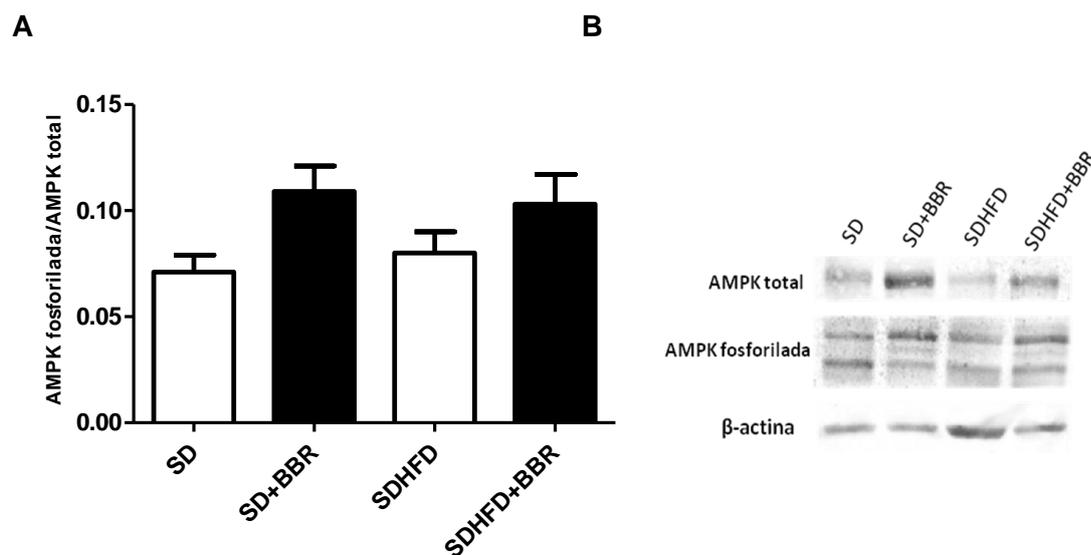


Figura 20: Efeitos da berberina nos níveis de AMPK na aorta.

(A) Níveis de expressão da AMPK fosforilada/AMPK total nos diferentes grupos em estudo. (B) Western blot representativo dos níveis da expressão da AMPK total e fosforilada em 10 $\mu$ g de proteína de homogeneizados de aorta nos diferentes grupos de animais em estudo.



## **4. DISCUSSÃO**



É do conhecimento de todos que a obesidade é um factor de risco para o desenvolvimento de inúmeras complicações ao nível da saúde, tais como, a resistência à insulina, a síndrome metabólica, a hipertensão e problemas cardiovasculares.

Neste estudo foi avaliada a eficácia terapêutica da berberina na obesidade associada à síndrome metabólica. Foram avaliados os seus efeitos na disfunção endotelial, nos parâmetros inflamatórios e quais as vias activadas pela berberina. Para tal foram utilizados animais normais e animais alimentados com uma dieta gorda que induziu um significativo aumento de peso neste grupo de animais (SDHFD). Os resultados demonstraram que a administração de berberina por via oral melhorou a resistência à insulina, diminuiu o peso corporal e melhorou a disfunção endotelial macrovascular em animais obesos.

Através da análise dos resultados verificámos que a dieta gorda aumentou o peso corporal dos animais e que a berberina diminuiu significativamente este parâmetro (animais SDHFD+BBR). Estes resultados estão de acordo com a literatura onde foi recentemente descrito que a berberina tem um efeito directo na adipogénese (Hu and Davies 2010; Yang, Yin et al. 2012). Esta diminuição de peso corporal pode dever-se à inibição da activação do receptor gama activado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ), cuja função está envolvida na regulação transcricional da adipogénese (Lee, Kim et al. 2006) e na activação de genes como a *adipocyte lipid-binding protein* (aP2) que promovem o armazenamento de gordura (Bordone and Guarente 2005). Uma vez presente, a berberina inibe a activação do PPAR $\gamma$  e conseqüentemente a gordura não é armazenada promovendo uma diminuição do peso corporal.

Como já foi referido em vários estudos, animais alimentados com dietas ricas em gorduras para além do aumento de peso, apresentam alterações ao nível do perfil lipídico, havendo aumento dos níveis de colesterol total e dos triglicéridos sistémicos (Hu and Davies 2010). Os nossos resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que os níveis de colesterol total aumentaram no grupo de animais SDHFD quando comparados com os animais controlo. Os triglicéridos apresentaram, contudo, valores idênticos aos ratos controlo. A administração da berberina diminuiu significativamente os valores de colesterol total e dos triglicéridos no grupo de animais SDHFD+BBR, cujo valor diminuiu tanto em relação aos SDHFD como relativamente ao próprio grupo SD. Esta diminuição do colesterol deve-se ao modo de acção da berberina que actua directamente ao nível do metabolismo dos lípidos. A berberina diminui a regulação de genes envolvidos na lipogénese e aumenta a regulação de genes que estão envolvidos no dispêndio energético tanto no tecido adiposo como no músculo esquelético (Affuso, Mercurio et al. 2010). Zhang et al, 2012 descreveu que a berberina diminui os níveis de triglicéridos ao nível do soro através da ativação do PPAR $\alpha$ . Esta diminuição dos triglicéridos é devida à indução de genes que diminuem a disponibilidade dos triglicéridos para a secreção de VLDL hepático

e a indução de genes que promovem a lipólise de triglicerídeos mediada pela lipoproteína lipase. Assim, como podemos observar nos nossos resultados ocorreu uma diminuição acentuada dos triglicerídeos nos animais SDHFD+BBR devido à acção da berberina. Vários autores sugerem que o outro mecanismo que pode estar activado no metabolismo dos lípidos na presença de berberina é a AMPK. A AMPK fosforila e inactiva a ACC, que é uma enzima chave na síntese dos ácidos gordos, levando assim a uma diminuição da síntese dos ácidos gordos e à inibição da síntese de triglicerídeos (Affuso, Mercurio et al. 2010; Li, Wang et al. 2011).

Uma consequência também da obesidade e do aumento de tecido adiposo são as substâncias secretadas por este tecido. Neste trabalho fomos averiguar os níveis sistémicos de leptina e adiponectina nos diferentes grupos em estudo. Está descrito que os níveis de leptina aumentam com a obesidade. Os elevados níveis de leptina em circulação estimulam os macrófagos presentes no tecido adiposo a libertarem citocinas inflamatórias e TNF- $\alpha$ , criando assim um ambiente pró-inflamatório prejudicial para vários tecidos, incluindo o fígado, o pâncreas, os vasos entre outros (Affuso, Mercurio et al. 2010; Younus and Rodgers 2011). Assim, o aumento da leptina está directamente relacionado com problemas vasculares, resistência à insulina, hipertensão, entre outros. Os animais em estudo apresentaram uma diminuição da leptina e um aumento da adiponectina nos grupo dos SDHFD+BBR. Este aumento conduz a efeitos benéficos como uma diminuição do peso corporal, uma diminuição da resistência à insulina e da inflamação e ainda do risco cardiovascular. Assim, é possível verificar que a berberina tem um efeito benéfico em ambas as adipocinas, diminui os níveis de leptina e aumenta os de adiponectina.

Na síndrome metabólica para além da obesidade uma questão fulcral é a resistência à insulina. Neste trabalho, avaliámos os níveis de insulina no plasma dos animais e verificámos que os animais com dieta gorda têm uma maior concentração de insulina quando comparados com os animais com dieta normal, o que nos sugere que os animais obesos começam a apresentar sinais de insulino-resistência. A obesidade conduz a resistência à insulina como já foi anteriormente demonstrado (Kim, Montagnani et al. 2006). A ingestão de uma dieta rica em gordura promove o desenvolvimento de resistência à insulina devido em grande parte à gordura visceral. De acordo com os nossos resultados os animais SDHFD apresentaram resistência à insulina uma vez que têm uma maior concentração de insulina em circulação, para fazer face ao aumento da glicose e apresentam o índice de resistência à insulina (HOMA) mais elevado. A berberina melhora a resistência à insulina. É visível nos animais SDHFD+BBR uma diminuição significativa do índice de insulino-resistência e também uma diminuição da concentração plasmática de insulina. Esta melhoria devida à berberina está de acordo com estudos prévios que reportam que a berberina tem um papel activo na via de sinalização da insulina (Kong,

Zhang et al. 2009) e ainda no metabolismo da glicose (Zhou, Yang et al. 2007). A berberina melhora a sensibilidade à insulina em animais obesos por um mecanismo que envolve o aumento da expressão de AMPK. Têm sido descritos outros mecanismos como o aumento da expressão do receptor de insulina, promovendo assim um aumento no consumo de glicose ao nível celular na presença de insulina. A berberina induz a expressão do receptor através de um mecanismo de regulação que envolve a proteína cinase C (PKC) (Kong, Zhang et al. 2009).

A disfunção endotelial é um dos eventos associados à obesidade e à resistência à insulina. Tanto na obesidade como na resistência à insulina, o aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias, a diminuição da secreção de adiponectina, a elevada concentração de ácidos gordos livres em circulação e a hiperglicemia podem alterar a expressão de genes e a sinalização celular ao nível do endotélio vascular (Affuso, Mercurio et al. 2010), promovendo assim alterações na libertação de produtos endoteliais, tanto vasodilatadores como vasoconstritores, o que conduz a alterações na função vascular normal (Huang 2003). No presente estudo, os resultados estão de acordo com o anteriormente descrito, ou seja, os animais SDHFD apresentaram uma diminuição na resposta vasodilatadora à acetilcolina quando comparados com os outros grupos de animais, o que nos sugere que efectivamente a obesidade e todos os factores que nela se encontram alterados conduzem a disfunção endotelial. O grupo SDHFD apresentou um relaxamento máximo dependente do endotélio de apenas 62% relativamente ao grupo de animais controlo. A diminuição da resposta dos animais obesos à acetilcolina demonstra que este grupo de animais apresenta disfunção endotelial. A estimulação dos receptores muscarínicos M3 pela acetilcolina liberta NO no endotélio que difunde para as células musculares e activa a guanilato ciclase solúvel (sGC), que por sua vez aumenta os níveis de cGMP e conduz ao relaxamento das células musculares lisas (Lam, Seto et al. 2006). A redução da quantidade de NO leva as células musculares a diminuírem o seu relaxamento. Outro factor que promove a reduzida capacidade de resposta a factores relaxantes derivados do endotélio é o facto de as células endoteliais estarem em contacto com níveis elevados de colesterol (Martinez-Gonzalez, Raposo et al. 2001), como acontece com os nossos animais que apresentam níveis de colesterol elevados. A administração da berberina melhorou significativamente a resposta do endotélio à acetilcolina. Os animais tratados com berberina, SD+BBR e SDHFD+BBR, apresentaram uma melhor sensibilidade à acetilcolina do que os animais SDHFD. Foi descrito que a berberina apresenta efeitos vasodilatadores mediados pela eNOS, promovendo a produção de NO através da activação da AMPK (A.F. Cicero 2009 ; Affuso, Mercurio et al. 2010). Embora não seja claro nos nossos resultados esse efeito de estimulação da eNOS, isto pode dever-se ao facto de estarmos a quantificar a eNOS em toda a parede vascular e não apenas na região

endotelial. A berberina melhorou a resposta de relaxamento dependente do endotélio, possivelmente porque aumentou a biodisponibilidade do óxido nítrico endotelial (Lam, Seto et al. 2006; van den Oever, Raterman et al. 2010; Razny, Kiec-Wilk et al. 2011).

Com vista a clarificar os mecanismos da berberina ao nível da aorta fomos avaliar a fosforilação da VASP como um parâmetro de avaliação de integridade da via de sinalização NO/cGMP e da actividade do NO. Os níveis de VASP na aorta são um indicador da integridade do endotélio em condições fisiológicas normais.

Na parede da artéria aorta, a fosforilação da VASP no resíduo serina 239 é um marcador útil de monitorização da activação e sinalização da via da proteína cinase G (PKG) (Oelze, Mollnau et al. 2000). A sua fosforilação no resíduo SER239 é um marcador de disfunção endotelial, devido a alterações na via de sinalização do NO/cGMP (Chen, Levine et al. 2008). No nosso estudo, verificámos que o grupo de animais obesos apresentou uma tendência para diminuir os níveis de VASP fosforilada/VASP total, sugerindo então que a obesidade promoveu alterações ao nível da via NO/cGMP. Seria de esperar uma diminuição da biodisponibilidade de NO e conseqüentemente uma diminuição no relaxamento das células musculares, uma vez que as células musculares são o principal alvo da sinalização NO/cGMP estando esta via de sinalização nas células endoteliais a emergir como um regulador chave na biologia vascular (Chen, Levine et al. 2008). Mais uma vez os nossos resultados podem estar a ser influenciados pela forma como foi feita a avaliação (em toda a parede da aorta e não apenas no endotélio). No entanto os resultados da avaliação da vasodilatação mediada por ACh comprovam que os animais obesos apresentam disfunção endotelial devido a uma diminuição da biodisponibilidade de NO pois respondem ao L-NAME diminuindo a resposta vasodilatadora à ACh. O tratamento com berberina apresentou uma tendência para melhorar a integridade da via de sinalização NO/cGMP que se traduziu por uma aumento dos níveis de expressão de VASP fosforilada/VASP total tanto nos grupo de animais SD+BBR como nos animais SDHFD+BBR (embora não significativo).

Para complementar o estudo da via de sinalização NO/cGMP fomos averiguar os níveis de expressão da eNOS ao nível da aorta e assim tentar correlacionar a actividade desta enzima com a redução da vasodilatação nos animais obesos. A eNOS promove a produção de NO, que como já foi referido anteriormente é um dos principais vasodilatadores ao nível da endotélio e mantém a homeostase vascular (Forstermann 2010). Tendo em conta os estudos funcionais e correlacionado com os níveis de expressão de eNOS ao nível da aorta seria de esperar que a obesidade levasse a uma diminuição da expressão desta enzima promovendo uma diminuição da função endotelial e diminuindo a resposta dos vasos à acção da acetilcolina. Contudo não houve diferenças significativas nos níveis de expressão da eNOS nos grupos em estudo. De acordo com a literatura, um dos mecanismos pelos

quais a berberina apresenta este efeito vasodilatador é a acção directa na via NO/cGMP na aorta (Kang, Sohn et al. 2002), levando a um aumento da sensibilidade à acção da acetilcolina, à activação de canais de potássio e à inibição da libertação de cálcio nas células musculares lisas. Outra explicação é o aumento da eNOS e conseqüente aumento da disponibilidade de NO por a activação da via da AMPK pela berberina ao nível endotelial. A via da AMPK vai actuar directamente na produção de NO promovendo assim uma melhoria no estado de disfunção endotelial. Por não estarmos a estudar directamente células endoteliais e musculares lisas separadamente, torna-se mais difícil visualizar os mecanismos de acção da berberina e explica os efeitos negativos observados na expressão da eNOS e VASP (Huang 2003; Lee, Kim et al. 2006; Forstermann 2010; Razny, Kiec-Wilk et al. 2011).

Neste estudo também fomos avaliar os níveis de expressão da AMPK fosforilada/AMPK total ao nível da aorta. Seria de esperar que a berberina conduzisse a um aumento dos níveis de expressão da AMPK nos animais que receberam o tratamento. No entanto, os níveis de expressão da AMPK não se modificaram. Está descrito que a berberina reduz a oxidação da glicose dependente de oxigénio através da inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Para compensar a redução na respiração aeróbia, foi observado que há um aumento na glicólise, sendo esta a via metabólica que requer mais glicose do que a respiração aeróbia para produzir a mesma quantidade de ATP. Como consequência, ocorre o aumento do consumo de glicose e aumenta a razão AMP/ATP, promovendo assim a activação da AMPK (Turner, Li et al. 2008). A AMPK parece ser a via principal pela qual a berberina actua sobre o metabolismo, promovendo todos os efeitos benéficos que se tem vindo a discutir, uma vez que a activação da AMPK pela berberina ocorre desde o metabolismo da glicose, ao metabolismo dos lípidos, na via do NO promovendo uma maior biodisponibilidade e produção de NO, ao nível da inflamação e também ao nível do *stress* oxidativo. Neste estudo, verificámos que a berberina não modificou os níveis de AMPK em homogeneizados da artéria aorta não sendo, por isso, esse o seu mecanismo de acção na aorta. No entanto, a berberina teve efeitos benéficos no metabolismo da glicose e dos lípidos que podem envolver esses mecanismos noutros tecidos (aqui não foram avaliados).

A obesidade está também associada a um aumento da inflamação. Avaliámos por isso a MCP-1 e verificámos uma tendência de aumento dos níveis de MCP-1 nos animais obesos quando comparados com os animais SD. A produção de MCP-1 é promovida pela acção do NF- $\kappa$ B (Boyle 2005; Jeong, Hsu et al. 2009). O NF- $\kappa$ B e a MCP-1 estão envolvidos nas fases iniciais da aterosclerose que ocorre muitas vezes associada à obesidade e ao aumento do colesterol total em circulação. A MCP-1 aumenta a inflamação e está envolvida no processo de recrutamento de macrófagos para os tecidos. A berberina parece ter um efeito benéfico na inflamação, com tendência para diminuir a MCP-1 na aorta

dos animais obesos. No entanto, estas variações não são signbificativas. A diminuição da MCP-1 ocorre devido à acção de inibição da activação do NF-KB pela berberina, logo uma vez que o NF-KB está inibido o MCP-1 também diminui (Wang, Huang et al. 2009).

Na base da disfunção endotelial surge o *stress* oxidativo (Forstermann and Munzel 2006). Os níveis elevados de *stress* oxidativo surgem associados à síndrome metabólica e à obesidade. As espécies reactivas de oxigénio reduzem a biodisponibilidade de NO o que conduz à disfunção endotelial. Fomos por isso, estudar o *stress* oxidativo ao nível da parede dos vasos nos diferentes grupos de animais, avaliando os níveis de anião superóxido que constitui um dos principais oxidantes do NO. A diminuição da disponibilidade de NO pode estar relacionada com o aumento dos níveis de anião superóxido ao nível da aorta. É possível observarmos que no grupo de animais com dieta gordo há uma aumento da fluorescência o que sugere que há uma aumento da produção do anião superóxido ao nível da artéria aorta, logo uma diminuição dos níveis de NO e um consequentemente surge a disfunção endotelial. A berberina promove uma diminuição da fluorescência ao nível das artérias dos grupos de animais SDHFD+BBR e SD+BBR. A berberina tem um efeito benéfico ao nível do *stress* oxidativo, diminuindo os níveis do anião superóxido, melhorando a função endotelial.

O *stress* oxidativo pode aumentar a glicação e os AGEs e por sua vez estes podem reduzir a biodisponibilidade e actividade de NO produzido no endotélio (Goldin, Beckman et al. 2006). Neste trabalho fomos também avaliar os níveis de CML, um conhecido e bem caracterizado AGE e também um dos mais abundantes, ao nível da artéria aorta. Foi possível observarmos que no grupo de animais com dieta gorda houve um aumento significativo do níveis de CML e que a administração com berberina diminuiu este parâmetro, embora não seja significativo. A acção da berberina na diminuição dos níveis de AGEs também passa pela activação da AMPK. De acordo com estudos já feitos parece haver uma relação entre a AMPK e as enzimas e vias metabólicas que determinam o balanço *redox* do endotélio. A AMPK consegue inibir a formação de ROS através da NADPH oxidase e estimular a produção de NO através da eNOS (Nedeljkovic, Gokce et al. 2003; Schramm, Matusik et al. 2012). Para além disso a activação da AMPK suprime a activação da JNK, a transcrição do NF-KB e a expressão de VCAM-1 ao nível das células endoteliais (Zhang, Zhou et al. 2009).

Com vista a complementar o estudo foi-se averiguar os níveis do receptor dos AGEs (RAGE), sendo este um alvo no tratamento de doenças metabólicas uma vez que está envolvido em doenças associadas à síndrome metabólica. Os níveis de expressão do RAGE não sofreu alterações nos diferentes grupos em estudo. A berberina veio promover uma diminuição, embora não significativa, da expressão do RAGE ao nível dos animais

SDHFD+BBR. Os níveis de RAGE e CML são paralelos o que demonstra que ocorre um certo paralelismo entre o CML e a expressão do RAGE.



## **5. CONCLUSÃO**



Neste trabalho avaliamos o potencial terapêutico da berberina ao nível da síndrome metabólica em modelos animais obesos.

Verificamos que a obesidade associada à síndrome metabólica leva a um desenvolvimento de resistência à insulina, alterações ao nível do funcionamento vascular – disfunção endotelial – e alterações tanto ao nível do metabolismo lipídico como da glicose.

A berberina promove uma melhoria ao nível da síndrome metabólica e da obesidade. O tratamento com berberina melhorou o peso corporal dos animais, os níveis de colesterol total e de triglicéridos e ainda a glicemia do jejum e hemoglobina A1c.

Demonstramos ainda que a berberina melhorou a sensibilidade à insulina nos animais obesos, diminuindo a concentração de insulina plasmática e o índice de insulino-resistência. Associado a isto verificamos uma diminuição dos níveis de leptina, cuja concentração é directamente proporcional com a insulino-resistência e verificamos um aumento dos níveis séricos de adiponectina dos animais tratados com berberina, cuja função está associada à diminuição do peso corporal e melhoria na sensibilidade à insulina por parte dos animais obesos. O aumento da sensibilidade à insulina é promovido pela activação da via da AMPK por parte da berberina de acordo com o que foi anteriormente descrito na literatura.

Os resultados evidenciaram uma diminuição da vasodilatação dependente do endotélio no grupo de animais obesos em resposta à acetilcolina o que demonstra que a função endotelial se apresenta comprometida. Verificou-se também que a berberina melhorou a resposta à acetilcolina uma vez que os grupos de animais tratados com berberina apresentaram uma maior sensibilidade à acetilcolina e uma normalização do relaxamento máximo dependente do endotélio. Os níveis de VASP e eNOS não sofreram alterações significativas.

Os níveis de inflamação também se encontram alterados ao nível da artéria aorta nos ratos obesos, facto que podemos comprovar com um ligeiro aumento dos níveis de expressão do MCP-1 ao nível da artéria aorta. A berberina veio promover uma diminuição destes níveis nas não significativo.

Relativamente ao aumento do stress oxidativo promovido pela obesidade, como podemos verificar com o aumento dos níveis do anião superóxido ao nível da parede da artéria aorta, podemos verificar que a berberina diminui significativamente o *stress* oxidativo nos grupos de animais sujeitos à terapêutica. Foi anteriormente descrito que o *stress* oxidativo também é diminuído pela acção da berberina na activação da via da AMPK.

Com este trabalho demonstramos que a berberina é um produto natural muito importante no combate a síndrome metabólica e a todas as suas complicações.

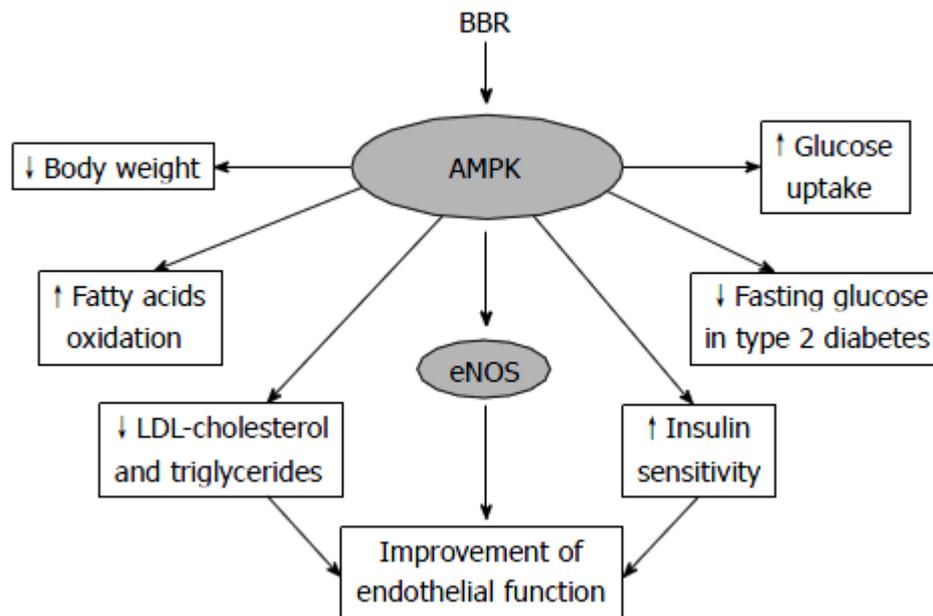


Figura 21:Esquema simplificado dos efeitos da berberina na síndrome metabólica que envolvem a ativação da AMPK e posterior regulação de um conjunto de parâmetros com influência na função endotelial. Adaptado de (Affuso, Mercurio et al. 2010)

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- A.F. Cicero, S. E. (2009). "Berberine: metabolic and cardiovascular effects in preclinical and clinical trials" Nutrition and Dietary Supplements **1**(1): 1-10.
- Affuso, F., V. Mercurio, et al. (2010). "Cardiovascular and metabolic effects of Berberine." World J Cardiol **2**(4): 71-77.
- Avogaro, A., S. V. de Kreutzenberg, et al. (2008). "Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus." Diabetes Res Clin Pract **82 Suppl 2**: S94-S101.
- Avogaro, A., G. P. Fadini, et al. (2006). "Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus." Nutr Metab Cardiovasc Dis **16 Suppl 1**: S39-45.
- Avramoglu, R. K., H. Basciano, et al. (2006). "Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states." Clinica Chimica Acta **368**(1-2): 1-19.
- Ballinger, S. W., C. Patterson, et al. (2002). "Mitochondrial integrity and function in atherogenesis." Circulation **106**(5): 544-549.
- Bordone, L. and L. Guarente (2005). "Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 298-305.
- Boyle, J. J. (2005). "Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture." Curr Vasc Pharmacol **3**(1): 63-68.
- Brownlee, M. (2005). "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." Diabetes **54**(6): 1615-1625.
- Busse, R. and I. Fleming (2006). "Vascular endothelium and blood flow." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 2): 43-78.
- Cade, W. T. (2008). "Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting." Phys Ther **88**(11): 1322-1335.
- Chen, H., Y. C. Levine, et al. (2008). "Atrial natriuretic peptide-initiated cGMP pathways regulate vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and angiogenesis in vascular endothelium." J Biol Chem **283**(7): 4439-4447.
- Dai, D. Z. and Y. Dai (2010). "Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities." Vasc Health Risk Manag **6**: 787-794.
- Dudzinski, D. M. and T. Michel (2007). "Life history of eNOS: partners and pathways." Cardiovasc Res **75**(2): 247-260.

- 
- Duvnjak, L. and M. Duvnjak (2009). "The metabolic syndrome - an ongoing story." J Physiol Pharmacol **60 Suppl 7**: 19-24.
- Elmarakby, A. A., E. D. Loomis, et al. (2005). "NADPH Oxidase Inhibition Attenuates Oxidative Stress but Not Hypertension Produced by Chronic ET-1." Hypertension **45(2)**: 283-287.
- Ergul, A. (2011). "Endothelin-1 and diabetic complications: focus on the vasculature." Pharmacol Res **63(6)**: 477-482.
- Fatehi-Hassanabad, Z., C. B. Chan, et al. (2010). "Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes." Eur J Pharmacol **636(1-3)**: 8-17.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2006). "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291(3)**: H985-1002.
- Forstermann, U. (2010). "Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease." Pflugers Arch **459(6)**: 923-939.
- Forstermann, U. and T. Munzel (2006). "Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace." Circulation **113(13)**: 1708-1714.
- Frayn, K. N. (2011). Diabetes Mellitus. Metabolic Regulation: A Human Perspective. Wiley-Blackwell. Oxford, United Kingdom, Wiley-Blackwell.
- Frey, R. S., M. Ushio-Fukai, et al. (2009). "NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology." Antioxid Redox Signal **11(4)**: 791-810.
- Giannotti, G. and U. Landmesser (2007). "Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis." Herz **32(7)**: 568-572.
- Goldin, A., J. A. Beckman, et al. (2006). "Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury." Circulation **114(6)**: 597-605.
- Guerci, B., A. Kearney-Schwartz, et al. (2001). "Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function." Diabetes Metab **27(4 Pt 1)**: 425-434.
- Hadi, H. A. and J. A. Suwaidi (2007). "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus." Vasc Health Risk Manag **3(6)**: 853-876.

- Hsueh, W. A. and M. J. Quinones (2003). "Role of endothelial dysfunction in insulin resistance." Am J Cardiol **92**(4A): 10J-17J.
- Hu, Y. and G. E. Davies (2010). "Berberine inhibits adipogenesis in high-fat diet-induced obesity mice." Fitoterapia **81**(5): 358-366.
- Huang, P. L. (2003). "Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction." Curr Hypertens Rep **5**(6): 473-480.
- Imanshahidi, M. and H. Hosseinzadeh (2008). "Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine." Phytother Res **22**(8): 999-1012.
- Jansson, P. A. (2007). "Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes." J Intern Med **262**(2): 173-183.
- Jeong, H. W., K. C. Hsu, et al. (2009). "Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E955-964.
- Kang, D. G., E. J. Sohn, et al. (2002). "Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGMP system in vessels." Vascul Pharmacol **39**(6): 281-286.
- Kim, J. A., M. Montagnani, et al. (2006). "Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms." Circulation **113**(15): 1888-1904.
- Kim, W. S., Y. S. Lee, et al. (2009). "Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(4): E812-819.
- Klabunde, R. E. (2011). Nitric Oxide. Cardiovascular Physiology Concepts. L. W. Wilkins.
- Kolluru, G. K., J. H. Siamwala, et al. (2010). "eNOS phosphorylation in health and disease." Biochimie **92**(9): 1186-1198.
- Kong, W. J., H. Zhang, et al. (2009). "Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression." Metabolism **58**(1): 109-119.

- Lam, T. Y., S. W. Seto, et al. (2006). "Impairment of the vascular relaxation and differential expression of caveolin-1 of the aorta of diabetic +db/+db mice." Eur J Pharmacol **546**(1-3): 134-141.
- Leahy, J. L. (2005). "Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." Arch Med Res **36**(3): 197-209.
- Lee, Y. S., W. S. Kim, et al. (2006). "Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states." Diabetes **55**(8): 2256-2264.
- Ley, K. and J. Reutershan (2006). "Leucocyte-endothelial interactions in health and disease." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 2): 97-133.
- Li, X. A., W. Everson, et al. (2006). "Nitric oxide, caveolae, and vascular pathology." Cardiovasc Toxicol **6**(1): 1-13.
- Li, Y., P. Wang, et al. (2011). "Activation of AMPK by berberine promotes adiponectin multimerization in 3T3-L1 adipocytes." FEBS Lett **585**(12): 1735-1740.
- Liu, L. Z., S. C. Cheung, et al. (2010). "Berberine modulates insulin signaling transduction in insulin-resistant cells." Mol Cell Endocrinol **317**(1-2): 148-153.
- Luo, N., J. Liu, et al. (2010). "Macrophage adiponectin expression improves insulin sensitivity and protects against inflammation and atherosclerosis." Diabetes **59**(4): 791-799.
- Madonna, R. and R. De Caterina (2012). "Atherogenesis and diabetes: focus on insulin resistance and hyperinsulinemia." Rev Esp Cardiol **65**(4): 309-313.
- Martinez-Gonzalez, J., B. Raposo, et al. (2001). "3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(5): 804-809.
- Muniyappa, R., M. Montagnani, et al. (2007). "Cardiovascular actions of insulin." Endocr Rev **28**(5): 463-491.
- Nedeljkovic, Z. S., N. Gokce, et al. (2003). "Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction." Postgrad Med J **79**(930): 195-199; quiz 198-200.

- Negre-Salvayre, A., R. Salvayre, et al. (2009). "Hyperglycemia and glycation in diabetic complications." Antioxid Redox Signal **11**(12): 3071-3109.
- Oelze, M., H. Mollnau, et al. (2000). "Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction." Circ Res **87**(11): 999-1005.
- Potenza, M. A., F. Addabbo, et al. (2009). "Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(3): E568-577.
- Potenza, M. A., S. Gagliardi, et al. (2009). "Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets." Curr Med Chem **16**(1): 94-112.
- Razny, U., B. Kiec-Wilk, et al. (2011). "Increased nitric oxide availability attenuates high fat diet metabolic alterations and gene expression associated with insulin resistance." Cardiovasc Diabetol **10**: 68.
- Schalkwijk, C. G. and C. D. Stehouwer (2006). "PAI-1 inhibition in obesity and the metabolic syndrome: a promising therapeutic strategy." Thromb Haemost **96**(6): 698-699.
- Schramm, A., P. Matusik, et al. (2012). "Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology." Vascul Pharmacol **56**(5-6): 216-231.
- Sena, C. M., P. Matafome, et al. (2011). "Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats." Br J Pharmacol **163**(2): 424-437.
- Shen, G. X. (2010). "Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase." Can J Physiol Pharmacol **88**(3): 241-248.
- Singh, B., S. Arora, et al. (2009). "Metabolic syndrome: A review of emerging markers and management." Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews **3**(4): 240-254.
- Tabit, C. E., W. B. Chung, et al. (2010). "Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications." Rev Endocr Metab Disord **11**(1): 61-74.
- Tang, L. Q., W. Wei, et al. (2006). "Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats." J Ethnopharmacol **108**(1): 109-115.
- Trujillo, M. E. and P. E. Scherer (2005). "Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome." J Intern Med **257**(2): 167-175.

- Turner, N., J. Y. Li, et al. (2008). "Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action." Diabetes **57**(5): 1414-1418.
- van den Oever, I. A., H. G. Raterman, et al. (2010). "Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus." Mediators Inflamm **2010**: 792393.
- Vykoukal, D. and M. G. Davies (2011). "Vascular biology of metabolic syndrome." J Vasc Surg **54**(3): 819-831.
- Wallace, J. P., B. Johnson, et al. (2010). "Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review." Int J Clin Pract **64**(3): 389-403.
- Wang, C., J. Li, et al. (2009). "Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin." Eur J Pharmacol **620**(1-3): 131-137.
- Wang, Y., T. Campbell, et al. (2011). "Hypoglycemic and insulin-sensitizing effects of berberine in high-fat diet- and streptozotocin-induced diabetic rats." Metabolism **60**(2): 298-305.
- Wang, Y., Y. Huang, et al. (2009). "Berberine prevents hyperglycemia-induced endothelial injury and enhances vasodilatation via adenosine monophosphate-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase." Cardiovasc Res **82**(3): 484-492.
- Yang, J., J. Yin, et al. (2012). "Berberine improves insulin sensitivity by inhibiting fat store and adjusting adipokines profile in human preadipocytes and metabolic syndrome patients." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 363845.
- Yang, Z. and X. F. Ming (2006). "Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis." Clin Med Res **4**(1): 53-65.
- Yin, J., Z. Gao, et al. (2008). "Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(1): E148-156.
- Younus, S. and G. Rodgers (2011). "Biomarkers associated with cardiometabolic risk in obesity." Am Heart Hosp J **9**(1): E28-32.
- Zhang, B. B., G. Zhou, et al. (2009). "AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome." Cell Metab **9**(5): 407-416.

Zhang, Q., X. Xiao, et al. (2011). "Berberine Moderates Glucose and Lipid Metabolism through Multipathway Mechanism." Evid Based Complement Alternat Med **2011**.

Zhou, L., Y. Yang, et al. (2007). "Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin." Metabolism **56**(3): 405-412.