



Título: Disfunção endotelial na obesidade – o papel da adiponectina

Autores:

Sara Ferreira Pinto Lourenço¹

Cristina Maria Tristão Sena^{2,3}

Raquel Maria Fino Seiça^{2,4}

¹**Afiliação:** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

Endereço: Rua do Casqueira, N.º 307, 4505-472 Lobão, Santa Maria da Feira, Portugal

Endereço do correio electrónico: sara_mosquita@msn.com

²**Afiliação:** Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

Endereço: Subunidade I – pólo 3, Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, Celas, Portugal

³ **Endereço do correio electrónico:** csena@fmed.uc.pt

⁴ **Endereço do correio electrónico:** rmfseica@gmail.com



ÍNDICE

1. RESUMO	3
ABSTRACT	5
2. OBJETIVOS	7
3. ESTADO DA ARTE.....	8
REFERÊNCIAS	13
4. TAREFAS.....	18
4.1. CARATERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIPONECTINA NUM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE: ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	18
4.2. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS ARTÉRIAS.....	21
4.3. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA eNOS NAS ARTÉRIAS.	22
4.4. AVALIAÇÃO DO STRESS OXIDATIVO	23
5. ORÇAMENTO PREVISTO PARA A EXECUÇÃO DO PROJETO.....	25
ABREVIATURAS	26



1. RESUMO

Um estilo de vida sedentário e uma dieta rica em hidratos de carbono e gorduras são as principais causas para o aumento do número de casos de obesidade, tornando a síndrome metabólica num problema de saúde mundial. A síndrome metabólica caracteriza-se por uma combinação de alterações que incluem a obesidade abdominal, a dislipidemia, a hipertensão arterial e a insulino-resistência (IR) as quais em conjunto, aumentam significativamente o risco de diabetes tipo 2 e doença cardiovascular.

A obesidade e a IR estão associadas a disfunção endotelial, que desempenha um papel fundamental na patologia cardiovascular. Os mecanismos que associam a obesidade, a IR e a disfunção endotelial são numerosos e complexos. A obesidade geralmente envolve a gordura visceral, o que conduz a um desequilíbrio de produtos metabólicos, hormonais e adipocitocinas como os ácidos gordos livres em circulação, o *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) e a adiponectina.

A adiponectina é uma adipocitocina maioritariamente produzida pelo tecido adiposo que circula em níveis relativamente elevados na corrente sanguínea. Exibe potentes efeitos anti-inflamatórios e ateroprotetores no tecido vascular, além da sua ação sensibilizadora para a insulina nos tecidos periféricos. Os níveis séricos de adiponectina diminuem em estados de obesidade e demonstrou-se uma associação entre os níveis de adiponectina circulante e a função endotelial. No entanto, os mecanismos subjacentes ao efeito benéfico da adiponectina na função endotelial não estão completamente esclarecidos.

O objetivo deste estudo é investigar os efeitos da adiponectina na disfunção endotelial associada à síndrome metabólica e, caracterizar alguns dos principais mecanismos de ação associados. Assim, os potenciais benefícios terapêuticos desta adipocitocina no endotélio vascular serão avaliados após administração de adiponectina a modelos animais obesos.



A síndrome metabólica será analisada em modelos animais obesos, nos quais a obesidade é induzida com uma dieta rica em gordura (DIO). Serão avaliados os benefícios terapêuticos da adiponectina em diferentes marcadores de *stress* oxidativo sistémicos e na parede das artérias e os níveis de expressão de diferentes proteínas associadas ao processo aterosclerótico. Avaliaremos o impacto da administração de adiponectina nos níveis de diferentes biomarcadores metabólicos, hormonais e inflamatórios.

É esperado que na presença deste composto seja normalizada a disfunção endotelial e substancialmente reduzida a IR e o *stress* oxidativo.

PALAVRAS-CHAVE: adiponectina, disfunção endotelial, síndrome metabólica, obesidade e insulino-resistência.



ABSTRACT

A sedentary lifestyle and a diet rich in carbohydrates and fats are the main causes for the increased incidence of obesity, making metabolic syndrome a worldwide health problem. Metabolic syndrome is characterized by a combination of changes that include abdominal obesity, dyslipidemia, hypertension and insulin resistance (IR) which together significantly increase the risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease.

Obesity and IR are associated with endothelial dysfunction that plays a key role in cardiovascular pathology. The mechanisms linking obesity, IR and endothelial dysfunction are numerous and complex. Obesity generally involves visceral fat, which leads to an imbalance of metabolic products, hormones and adipocytokines like free fatty acids in circulation, tumor necrosis factor-alpha and adiponectin.

Adiponectin is an adipocytokine primarily produced by adipose tissue that circulates at relatively high levels. It exhibits potent anti-inflammatory and atheroprotective effects in vascular tissue in addition to its insulin sensitizing action in peripheral tissues. Serum adiponectin decreases in obesity and an association between circulating adiponectin levels and the endothelial function has been previously demonstrated. However, the mechanisms underlying the beneficial effect of adiponectin on endothelial function are not completely understood.

The aim of this study is to investigate the effects of adiponectin on endothelial dysfunction associated with metabolic syndrome and characterize some of its major mechanisms of action. Thus, the potential therapeutic benefits of this adipocytokine on vascular endothelium will be evaluated after administration of adiponectin to obese animal models.



Metabolic syndrome will be evaluated in high-fat diet (DIO) induced obesity (DIO) rats. The therapeutic benefits of adiponectin in different systemic and arterial wall oxidative stress markers and the expression of different proteins associated with atherosclerosis will be evaluated. The impact of the administration of adiponectin in the levels of different metabolic, hormonal and inflammatory biomarkers will also be done.

It is expected that, in the presence of this compound, the endothelial dysfunction returns to normal and that IR is substantially reduced as well as oxidative stress.

KEYWORDS: adiponectin, endothelial dysfunction, metabolic syndrome, obesity and insulin resistance.



2. OBJETIVOS

Este projeto tem como principal objetivo investigar os efeitos da adiponectina na disfunção endotelial associada à síndrome metabólica e caracterizar alguns dos principais mecanismos de ação associados.

Os objetivos específicos são:

1. Avaliar os efeitos terapêuticos da adiponectina em diferentes marcadores de *stress* oxidativo sistémico e na parede dos vasos;
2. Quantificar os níveis de expressão de diferentes proteínas associadas ao processo aterosclerótico;
3. Estudar o impacto da administração da adiponectina nos níveis de diferentes biomarcadores metabólicos, hormonais e inflamatórios.



3. ESTADO DA ARTE

A moderna dieta ocidental associada a um estilo de vida sedentário conduziu à presente epidemia de obesidade [1]. Atualmente é claro que a presença de obesidade aumenta substancialmente o risco de comorbilidades a ela associadas, nomeadamente IR, intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão, entre outras [2]. A associação das patologias acima referidas são comumente designadas por síndrome metabólica [3,4].

O tecido adiposo, além da sua função clássica de armazenamento energético, apresenta-se como um importante órgão com funções endócrinas e imunológicas [5,6,7,8], que desempenha um papel importante na integração de sinais endócrinos, metabólicos e inflamatórios e no controlo da homeostasia energética [6].

Como tecido secretor, o tecido adiposo apresenta algumas características incomuns: em vez de confinado a uma localização específica, é encontrado por todo o organismo em acumulações individuais que não comunicam entre si; é constituído por diferentes tipos de células como adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos e macrófagos, sendo que todos, em maior ou menor grau, têm capacidades secretoras; é heterogéneo nas suas funções metabólicas, dependendo da sua localização ser visceral ou subcutânea [4].

Na obesidade, o tecido adiposo, particularmente o visceral que se caracteriza por hipertrofia dos adipócitos e infiltração de macrófagos, torna-se disfuncional [8], com aumento da produção de agentes pró-inflamatórios, aterogénicos e de substâncias vasoconstritoras, que contribuem para a disfunção endotelial, inflamação vascular e diminuição da adiponectina [9].

O endotélio é uma monocamada contínua de células organizadas que funciona na interface entre o sangue circulante e os tecidos subjacentes [10], possuindo diversas funções [11]. O endotélio produz substâncias vasoativas, fatores de crescimento e citocinas e funciona como um mecanotransdutor que é sensível ao fluxo sanguíneo e à pressão e modula o tónus vascular em conformidade. O endotélio é uma fonte de inúmeros mediadores que modulam o



estado contrátil e as respostas proliferativas das células musculares lisas, a função plaquetária, a coagulação e a adesão de monócitos. A produção de substâncias pelo endotélio pode ser estimulada por células como os leucócitos e as plaquetas e, também por forças físicas como o *shear stress* [10]. Assim, em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tónus vascular e da homeostase, mantendo o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória [12].

Através da sua função autócrina/parácrina, o endotélio regula a secreção de múltiplos fatores vasodilatadores [óxido nítrico (NO), prostaciclina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio] e vasoconstritores (endotelinas e angiotensina) [12,13].

O NO é o vasodilatador melhor caracterizado e um dos mais importantes [13]. O NO é um gás volátil e biologicamente ativo [10]. Tem um tempo de meia vida muito curto [14] e está presente em praticamente todos os tecidos devido ao seu baixo peso molecular e às suas propriedades lipofílicas, que lhe permitem uma fácil difusão através das membranas celulares [10]. O NO é produzido por ação da sintase do monóxido de azoto ou óxido nítrico sintase (NOS) [10] e tem uma produção e libertação basais e uma outra dependente da influência de vários agonistas (acetilcolina, bradicinina, substância P e serotonina, entre outros) [13].

O endotélio é ainda capaz de produzir e libertar fatores antioxidantes (superóxido dismutase) e substâncias, tais como heparanos, prostaciclina e peptídeos natriuréticos [12].

A disfunção endotelial refere-se a um desequilíbrio na produção de mediadores que regulam o tónus vascular, a agregação plaquetária, a coagulação, a fibrinólise e a inflamação [15]. Porém, este termo é frequentemente usado para se referir ao comprometimento do relaxamento dependente do endotélio, causado pela perda da atividade do NO na parede dos vasos [16].



A adiponectina é uma das mais abundantes adipocitocinas [1] produzida maioritariamente pelo tecido adiposo branco e, de acordo com alguns autores, também pelo castanho [17].

A adiponectina é uma proteína plasmática de aproximadamente 30 KDa [6,15,19] e é constituída por 247 aminoácidos, consistindo em 4 domínios: uma sequência amino terminal, uma região variável, um domínio colagenoso (cAd) e um domínio globular no terminal carboxílico (gAd) [6]. O gene da adiponectina localiza-se no cromossoma 3q27, um locus associado a suscetibilidade a diabetes mellitus [20,21].

Existem dois subtipos de recetores da adiponectina, Adipo R1 e Adipo R2, que são predominantemente expressos no músculo e no fígado, respetivamente. Estes recetores parecem ter sete domínios transmembranares mas, são estrutural e funcionalmente diferentes dos recetores acoplados a uma proteína G [22]. Os recetores Adipo R1 e Adipo R2 medeiam a ativação da monofosfato de adenosina (AMP) cinase e do *peroxixome-proliferator activated receptor alpha* (PPAR α) [23].

A adiponectina circula no plasma numa concentração de 1,9-17 $\mu\text{g/mL}$ [24,25] e a sua semivida é de 2,5 horas na corrente sanguínea [26]. Os níveis circulantes de adiponectina não variam substancialmente no período pós-prandial [15]. Concentrações mais baixas de adiponectina são encontradas no homem relativamente à mulher [5,15,24], o que poderá refletir um efeito das hormonas sexuais [27]. Os glicocorticóides, os agonistas β -adrenérgicos e as citocinas como o TNF- α e a interleucina (IL) 6 são fatores que diminuem a expressão de adiponectina, enquanto a exposição ao frio, a adrenalectomia e o *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) se associam ao aumento da sua expressão [28,29].

Ao contrário da maioria das proteínas segregadas pelos adipócitos, a concentração de adiponectina diminui na obesidade [5,6,9,15,19,30,31,32,33,34]. Esta correlação negativa é mais evidente na obesidade visceral do que na subcutânea [34].



Uma baixa concentração plasmática de adiponectina causa disfunção endotelial [8] e associa-se a um risco aumentado de doenças cardiovasculares [32], em relação, pelo menos em parte, com as suas propriedades anti-inflamatórias e na sensibilidade dos tecidos à insulina [1,9].

A diminuição da adiponectina parece estar envolvida na IR, hipertensão, aterosclerose, doença hepática não alcoólica e esteatohepatite, insuficiência cardíaca e inflamação das vias aéreas e no desenvolvimento de alguns tipos de cancro relacionados com a obesidade [9].

Ao nível dos vasos sanguíneos, a adiponectina exerce efeitos vasorrelaxantes [8], promovendo a vasodilatação dependente do endotélio, através da ativação da NOS endotelial (eNOS), aumentando assim, o NO [1,8,9,12,19,35]. Exerce uma ação protetora do endotélio contra o *stress* oxidativo [9], diminuindo a produção do anião superóxido [15], que é responsável pela redução da biodisponibilidade de NO como resultado do desacoplamento da eNOS [9]. Por outro lado, o aumento dos níveis do anião superóxido conduz à formação de peroxinitrito, que prejudica ainda mais a atividade da eNOS e diminui a produção de NO [36]. Ainda ao nível do endotélio, a adiponectina inibe a ativação das células endoteliais e a adesão dos monócitos [9,32]. A ativação das células endoteliais caracteriza-se pelo aumento da expressão de moléculas de adesão [molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e E-seletina] e pela produção de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente o TNF- α e as IL1 e IL8 [9]. Este efeito anti-inflamatório da adiponectina nas células endoteliais, mediado pela inibição da formação e da ação do TNF- α [6,33] e pela inibição da IL8 e de moléculas de adesão, parece ser mediado pela supressão da ativação do fator nuclear-kB (NF-kB) [6,37,38]. As concentrações sistémicas de outros marcadores inflamatórios, como a proteína C reativa (PCR) e a IL6, estão também inversamente correlacionadas com a concentração plasmática da adiponectina [6,38].



A adiponectina possui efeitos anti-aterogénicos [1,6,12,19,30,32,33,39]. Este efeito parece ser mediado pela inibição da ativação dos macrófagos e da formação de células espumosas [6,9,38]. Os macrófagos ativados internalizam lipoproteínas oxidadas ou glicadas, transformando-se eles próprios em células espumosas [9]. As citocinas pró-inflamatórias, que medeiam a resposta inflamatória local, são libertadas pelas células espumosas, amplificando o processo aterosclerótico [40]. Por outro lado, a adiponectina é capaz de diminuir a proliferação e a migração das células musculares lisas vasculares [1,9,15,38]. Os níveis baixos de adiponectina foram recentemente considerados como um fator independente preditor da aterosclerose precoce em indivíduos obesos [41]. Assim, a adiponectina parece atuar como um mecanismo fundamental que associa a inflamação vascular e a aterosclerose [6].

A adiponectina não parece atuar primariamente como secretagogo de insulina [6] mas, à adiponectina é atribuído o aumento da sensibilidade dos tecidos à insulina [1,6,9,12,30,33,38]. Este efeito é mediado, pelo menos em parte, por um aumento da oxidação de ácidos gordos via AMP cinase, semelhante à ação sinalizada pela própria insulina. Além disso, a adiponectina diminui a produção hepática de glicose, inibindo as enzimas da gliconeogénese e, por isso, contribui para a redução da concentração plasmática de glicose [38,42].

Deste modo, a adiponectina possui ações pleotrópicas em inúmeros processos metabólicos e fisiológicos. Aumentar os níveis plasmáticos de adiponectina poderá corresponder a uma abordagem holística no combate à mortalidade e morbidade associadas à obesidade.



REFERÊNCIAS

- 1) Hui X, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Adiponectin and cardiovascular health: an update. *Br J Pharmacol*. 2012 Feb;165(3):574-90.
- 2) Reaven G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002 Jul 16;106(3):286-8.
- 3) Reaven GM. Syndrome X. *Blood Press Suppl*. 1992;4:13-6.
- 4) Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab*. 2004 Feb;30(1):13-9.
- 5) Haluzík M, Parízková J, Haluzík MM. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol Res*. 2004;53(2):123-9.
- 6) Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. 2003 Aug;26(8):2442-50.
- 7) Bahia L, Aguiar LG, Villela N, Bottino D, Godoy-Matos AF, Geloneze B, Tambascia M, Bouskela E. Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2006 Oct;61(5):433-40.
- 8) Maenhaut N, Van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med*. 2011 Mar 16;9:25.
- 9) Li FY, Cheng KK, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Sep;203(1):167-80.
- 10) Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol*. 2006 Feb 23;5:4.



- 11) Eringa EC, Bakker W, van Hinsbergh VW. Paracrine regulation of vascular tone, inflammation and insulin sensitivity by perivascular adipose tissue. *Vascul Pharmacol*. 2012 May-Jun;56(5-6):204-9.
- 12) Bahia L, de Aguiar LG, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. [The endothelium in the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Apr;50(2):291-303.
- 13) Sena CM, Nunes E, Louro T, Proença T, Seiça RM. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes: effect of antioxidants. *Rev Port Cardiol*. 2007 Jun;26(6):609-19.
- 14) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315-424.
- 15) de Carvalho MH, Colaço AL, Fortes ZB. [Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Apr;50(2):304-12.
- 16) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000 Nov 10;87(10):840-4.
- 17) Viengchareun S, Zennaro MC, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett*. 2002 Dec 18;532(3):345-50.
- 18) Gustafsson S, Lind L, Söderberg S, Ingelsson E. Associations of circulating adiponectin with measures of vascular function and morphology. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Jun;95(6):2927-34.
- 19) Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2563-8.
- 20) Stumvoll M, Tschritter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M, Machicao F, Häring H. Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):37-41.



- 21)** Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, Matsukawa Y, Okutomi K, Horie M, Shimomura I, Hotta K, Kuriyama H, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Jul;24(7):861-8.
- 22)** Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003 Jun 12;423(6941):762-9.
- 23)** Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005 May;26(3):439-51.
- 24)** Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 2;257(1):79-83.
- 25)** Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002 Mar;13(2):84-9.
- 26)** Hoffstedt J, Arvidsson E, Sjölin E, Wåhlén K, Arner P. Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Mar;89(3):1391-6.
- 27)** Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002 Sep;51(9):2734-41.



- 28)** Makimura H, Mizuno TM, Bergen H, Mobbs CV. Adiponectin is stimulated by adrenalectomy in ob/ob mice and is highly correlated with resistin mRNA. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Dec;283(6):E1266-71.
- 29)** Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 25;290(3):1084-9.
- 30)** Guerre-Millo M. Adiponectin: an update. *Diabetes Metab.* 2008 Feb;34(1):12-8.
- 31)** Matsuzawa Y. Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl.* 2005 May;6(2):7-14.
- 32)** Guimarães DED, Sardinha FLC, Mizurini DM and Tavares do Carmo MG. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Rev Nutr.* 2007 Set/Out;20(5):549-59.
- 33)** Costa JV, Duarte JS. Adipose tissue and adipokines. *Acta Med Port.* 2006 May-Jun;19(3):251-6.
- 34)** Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):29-33.
- 35)** Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003 Nov 7;278(45):45021-6.
- 36)** Grattagliano I, Palmieri VO, Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J Nutr Biochem.* 2008 Aug;19(8):491-504.
- 37)** Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-



- kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation*. 2000 Sep 12;102(11):1296-301.
- 38)** Han SH, Quon MJ, Kim JA, Koh KK. Adiponectin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Feb 6;49(5):531-8.
- 39)** Tan KC, Xu A, Chow WS, Lam MC, Ai VH, Tam SC, Lam KS. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Feb;89(2):765-9.
- 40)** Libby P, Ridker PM, Hansson GK; Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1;54(23):2129-38.
- 41)** Shargorodsky M, Boaz M, Goldberg Y, Matas Z, Gavish D, Fux A, Wolfson N. Adiponectin and vascular properties in obese patients: is it a novel biomarker of early atherosclerosis? *Int J Obes (Lond)*. 2009 May;33(5):553-8.
- 42)** Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1288-95.



4. TAREFAS

Neste trabalho irão ser realizadas quatro tarefas de forma a responder aos objetivos formulados.

4.1. CARATERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA ADIPONECTINA NUM MODELO ANIMAL DE OBESIDADE: ESTUDOS *IN VIVO*.

RESULTADOS ESPERADOS

Com esta tarefa pretende-se confirmar que a dieta gorda (DG) induz, neste modelo animal, um aumento do peso corporal, da pressão arterial, do *stress* oxidativo e da inflamação, da IR e da dislipidemia, típicas da síndrome metabólica e que a administração de adiponectina melhora o perfil metabólico, o *stress* oxidativo e a inflamação.

DESCRIÇÃO

Neste estudo serão utilizados ratos Wistar, que se vão dividir em quatro grupos (n=10 por grupo):

- i)** Wistar – controlo - um grupo de animais Wistar controlo, mantido com ração standard;
- ii)** Wistar – DIO - um grupo de animais Wistar mantido com dieta rica em gorduras (DG: 20% proteínas, 20% de hidratos de carbono e 60% de gordura) durante 4 meses (dos 8 aos 12 meses de idade);
- iii)** Wistar – DIO + adiponectina - um grupo de animais Wistar mantido com dieta gorda (DG) e ao qual se vai administrar 2.7 µg de adiponectina por via subcutânea, através de uma bomba de infusão contínua (com uma velocidade de 2,5 µL/min), durante 28 dias antes do sacrifício;



iv) Wistar – DIO + veículo - um grupo de animais Wistar mantido com DG e ao qual se vai administrar a solução veículo (bomba infusora).

Os animais serão mantidos em salas com ventilação, temperatura (22-24°C) e humidade (50-60%) adequadas e com ciclos alternados de 12 horas de luz e escuridão.

Serão avaliados os seguintes parâmetros, nos diferentes grupos de animais em estudo:

1. Peso corporal (os animais são pesados de manhã);
2. Pressão arterial por pletismografia na artéria caudal utilizando o sistema *Rat Tail Blood Pressure System For Rats and Mice 2000 (Kent Scientific Corporation)*. Os animais serão colocados no interior de um tubo cilíndrico de acrílico, encaixando-se a cauda dos animais num manguito de borracha que é adaptado à região proximal da cauda e ligado a um esfigmomanómetro;
3. Prova de tolerância à glicose: Após um jejum de 15-16 horas, serão determinados os valores da glicose sanguínea pelo método da glicose-oxidase, utilizando um glicómetro e tiras teste reativas compatíveis. Depois será determinada a glicemia aos 30, 60, 90 e 120 minutos após administração de glicose por via intra-peritoneal (1,75 g de glicose/Kg de peso corporal);
4. Lípidos séricos (triglicerídeos, colesterol total e HDL): determinação por analisador automático;
5. Concentração sanguínea de adiponectina (ELISA kit, *R&D Systems*), leptina (ELISA kit, *R&D Systems*) e insulina (ELISA kit, *Mercodia*);
6. Com recurso ao modelo de avaliação homeostática (HOMA), será quantificado o índice de IR.

$$HOMA_{IR} = \text{Insulina}_{\text{jejum}} (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glicose}_{\text{jejum}} (\text{mmol/L}) / 22,5$$



7. Marcadores inflamatórios: determinação da PCR (ELISA kit, *BioVendor*);
8. Marcadores de *stress* oxidativo:
 - . Oxidação de proteínas: determinação dos níveis plasmáticos de grupos carbonilo (*Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit, Cayman Europe*);
 - . Peroxidação lipídica: determinação de isoprostanos [*8-Isoprostane enzyme immunoassay (EIA) Kit, Cayman Europe*];
 - . Oxidação do DNA: determinação da 8-hidroxi-desoxiguanosina (*8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA Kit, Cayman Europe*).
9. Função renal: quantificação da creatinina no plasma e na urina (kit *Randox laboratories*) para determinação da *clearance* da creatinina.

A colheita de amostras de sangue e urina será realizada nos diferentes grupos de animais:

- Recolha de sangue por punção cardíaca. Com os animais anestesiados com cloridrato de quetamina (75mg/kg) e cloridrato de clorpromazina (3mg/kg) intramuscular, o sangue é colhido para tubos BDVacutainer com e sem EDTA (4,5 mg), de forma a obter, respetivamente, plasma e soro. De seguida, as amostras são centrifugadas a 2500 g a 4°C durante 10 minutos, aliquotadas e armazenadas a - 80°C.

- Recolha da urina das 24 horas através do recurso a gaiolas metabólicas (*Tecniplast*).



4.2. AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS ARTÉRIAS.

RESULTADOS ESPERADOS

Com esta tarefa pretende-se confirmar que a DG induz, neste modelo animal, alterações na vasodilatação dependente e independente do endotélio das artérias aorta e mesentéricas e que a administração de adiponectina melhora estes efeitos.

DESCRIÇÃO

Depois de anestesiados e após a recolha das amostras sanguíneas, os grupos de animais apresentados na tarefa 1 são sacrificados por deslocamento cervical. As artérias aorta e mesentéricas são retiradas cuidadosamente de cada animal, sendo limpas de tecido conjuntivo, de modo a preservar o endotélio (alguns dos segmentos destas artérias são congelados em azoto líquido para estudos posteriores).

Os segmentos das artérias são suspensos numa câmara de perfusão com capacidade de 5 mL, contendo solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mmol/L): NaCl - 118,6; KCl - 4,7; CaCl₂ - 1,6; NaHCO₃ - 25,0; MgSO₄ - 1,18; KH₂PO₄ - 1,18; Glicose - 11,0. A solução é mantida a uma temperatura de 37°C, pH de 7,4 e oxigenada, com uma mistura de gases contendo 95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono. Os anéis vasculares são montados entre os ganchos de aço inoxidável em câmaras separadas, ligados de um lado a um suporte e, do outro, a um transdutor de força (*PowerLab*). Aplicando uma tensão de 1g, distendem-se os anéis, sendo perfundidos de seguida durante 15 minutos.

Posteriormente, os segmentos são contraídos com fenilefrina (3 µM). Após a estabilização da contração é estudada a biodisponibilidade de NO por adição cumulativa de acetilcolina ao banho de 10⁻¹⁰-10⁻² (vasodilatação dependente do endotélio), enquanto o nitroprussiato de sódio é adicionado de forma cumulativa ao banho de 10⁻¹⁰-10⁻³, para avaliar a vasodilatação independente do endotélio.



4.3. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA eNOS NAS ARTÉRIAS.

RESULTADOS ESPERADOS

A eNOS é uma enzima responsável pela síntese de NO, um potente vasodilatador endotelial. Com esta tarefa pretende-se observar se existem alterações nos níveis desta enzima nas artérias dos diferentes grupos e se a administração de adiponectina aumenta os níveis desta enzima.

DESCRIÇÃO

Os segmentos de endotélio das artérias dos ratos são lavados com solução salina fosfatada e arrefecidos em solução tamponada contendo (em mM) Tris-HCL 50, NaCl 150, EDTA 1, ácido etileno-glicol-tetracético 0,1, Nonidet P-40 0,1%, SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1% e desoxicolato de sódio a 0,5%. Com o intuito de inibir as proteases, adiciona-se fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1mM; aprotinina 10 µg/ml; leupeptina 10 µg/ml e pepstatina 10 µg/ml (*Sigma Chemicals*).

De seguida, os tecidos são homogeneizados e centrifugados a 14000g durante 20 minutos a 4°C, sendo determinadas as proteínas totais sobrenadantes. Após a adição de 50 µg de proteína ao gel SDS-PAGE a 8%, é corrido o *eletroblot* em membrana de nitrocelulose. Os *blots* são bloqueados por uma solução salina fosfatada tamponada com leite magro, durante 60 minutos e, incubados com anticorpo anti-eNOS ou anti-eNOS fosforilada (*Transduction Laboratory*) durante a noite. Após a incubação primária, a membrana é lavada com solução salina e novamente incubada, durante 60 minutos, com anticorpos secundários ligados a uma fosfatase alcalina. Os *imunoblots* são lavados com solução salina e incubados com substrato enzimático ECF, durante alguns segundos, seguida de secagem da membrana em papel de filtro. A revelação é feita por um sistema de deteção de *western blotting*.



4.4. AVALIAÇÃO DO STRESS OXIDATIVO

RESULTADOS ESPERADOS

O anião superóxido e a nitrotirosina são marcadores de *stress* oxidativo. Assim, com esta tarefa pretende-se determinar os níveis destas moléculas, confirmando que a DG induz, neste modelo animal, aumento destes marcadores e avaliar se estas alterações são reversíveis com a administração de adiponectina.

DESCRIÇÃO

. Determinação dos níveis de anião superóxido

Nos segmentos da aorta e artérias mesentéricas são realizados cortes histológicos com cerca de 6 µm de espessura que depois são congelados e não fixados. Posteriormente, são incubados com dihidroetídio (DHE) em solução salina fosfatada (PBS), durante 30 minutos, a 37°C em câmara húmida protegida da luz. O DHE é oxidado pelo anião superóxido, originando brometo de etídio, que se liga ao DNA e emite fluorescência vermelha.

A deteção do brometo de etídio é realizada recorrendo a um microscópio de fluorescência Bio-Rad MRC-600, equipado com laser kriptón/árgon, utilizando um filtro de 568nm.

. Determinação de nitrotirosina

Os cortes histológicos de 6 µm de segmentos das artérias são descongelados e secos, seguidos de fixação em acetona (-20°C). Posteriormente são re-hidratados em PBS até o meio de montagem (OCT, *Shandon Criomatrix*, *Thermon Electron Corporation*) desaparecer. De seguida, permeabilizam-se em PBS com Triton a 1% durante 10 minutos. O bloqueio das ligações não específicas é realizado com recurso a soro de cabra a 10% em PBS a 0,2% durante 30 minutos.



Os cortes são, então, incubados com anticorpo primário de coelho anti-nitrotirosina (*Upstate Biotechnology*), durante 12 horas. De seguida, são lavados e incubados com anticorpo secundário anti-coelho (*Molecular Probes*), durante 60 minutos. Utilizando um microscópio de fluorescência Bio-Rad MRC – 600, com um filtro de excitação 485 nm, observar-se-á a fluorescência verde indicadora da presença de nitrotirosina.



5. ORÇAMENTO PREVISTO PARA A EXECUÇÃO DO PROJETO

Ratos Wistar – 1000 €

Ração especial – 3500 €

Adiponectina – 7500 €

Cloridrato de quetamina – 75 €

Cloridrato de clorpromazina – 4 €

ELISA kit: adiponectina (R&D Systems) – 475 €

ELISA kit: leptina (R&D Systems) – 475 €

ELISA kit: insulina (Merckodia) – 400 €

Creatinina (*Randox laboratories*) – 40 €

Hs PCR kit – 900 €

Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit (Cayman Europe) – 288 €

8-Isoprostane enzyme immunoassay (EIA) Kit (Cayman Europe) – 324 €

8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA Kit (Cayman Europe) – 504 €

Fenilefrina – 46,5 €

Acetilcolina – 34,6 €

Nitroprussiato de sódio – 89,7 €

Anticorpo anti-eNOS (*Transduction Laboratory*) – 400 €

Anticorpo anti-eNOS fosforilada (*Transduction Laboratory*) – 400 €

Anticorpo primário de coelho anti-nitrotirosina (*Upstate Biotechnology*) – 350 €

Anticorpo secundário anti-coelho (*Amersham Biosciences*) – 500 €

Outros reagentes – 1500 €

TOTAL: 18 805,8 €



ABREVIATURAS

AMP – monofosfato de adenosina

DG – dieta gorda

DHE - dihidroetídeo

DIO – obesidade induzida pela dieta

EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*

EIA – *enzyme immunoassay*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*

IR – insulino-resistência

IL – interleucina

NF- κ B – factor nuclear - κ B

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

PBS – solução salina fosfatada

PCR – proteína C reativa

PPAR α – *peroxisome-proliferator activated receptor alpha*

TNF- α – *tumor necrosis factor alpha*