

TÍTULO

INFLUÊNCIA DOS AGEs NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA DURANTE A HIPOXIA DO TECIDO ADIPOSEO

**AGEs ON INSULIN SIGNALING DURING A PARTIAL LOSS OF
ADIPOSE TISSUE IRRIGATION**

Ana Beatriz Amaral¹, Tiago Rodrigues, Paulo Matafome e Raquel Seica

Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Contactos¹

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

E-mail: anaamaral1990@gmail.com

Trabalho financiado por:

IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)

RESUMO

Introdução: Nos indivíduos obesos, a hipoxia do tecido adiposo é comumente observada, podendo associar-se a diminuição da sensibilidade à insulina e diabetes tipo 2. Nos diabéticos, os produtos avançados da glicação (AGEs), que podem estar envolvidos na resistência à insulina através da activação de vias oxidativas e inflamatórias, ocorrem em elevadas concentrações.

Objectivo: Avaliar o papel dos AGEs na sinalização da insulina no tecido adiposo, em condições de hipoxia, independentemente da obesidade, utilizando um modelo de isquemia de tecido adiposo.

Métodos: Administrou-se metilglioxal, durante 8 semanas, a ratos Wistar (WM; n=8), sendo 4 submetidos a laqueação da artéria genital esquerda, de forma a induzir isquemia, durante 48 horas. O mesmo procedimento foi efectuado em ratos Wistar normais (W; n=8). No final, recolheu-se o tecido adiposo epididimal isquémico, enquanto o direito foi utilizado como controlo interno. Analisaram-se os níveis sistémicos de glicose, insulina, triglicédeos e ácidos gordos livres em jejum e os níveis tecidulares e activação de proteínas envolvidas na sinalização da insulina.

Resultados: Após a isquemia, observou-se um aumento da glicemia e da insulinemia em ambos os grupos (W e WM), bem como um aumento dos triglicédeos nos ratos tratados com metilglioxal. Nestes animais, verificou-se uma diminuição dos níveis do I κ B α e da Akt fosforilada.

Conclusões: A isquemia do tecido adiposo, que pode ocorrer na obesidade, pode ter repercussões metabólicas sistémicas, aparentemente potenciadas pela acumulação de produtos glicados no tecido. Estes resultados sugerem que estes mecanismos podem estar implicados na disfunção metabólica associada ao desenvolvimento de DM2.

Palavras-chave: tecido adiposo, AGEs, insulino-resistência, hipoxia, diabetes tipo 2

Lista de abreviaturas: AGE, produtos avançados de glicação; CEL, carboxietilisina; DM, diabetes mellitus; DM2, diabetes tipo 2; GLUT, transportador da glicose; HIF, factor induzido pela hipoxia; IKK, inibidor da cinase kappa B; IL, interleucina; IRS, substrato do receptor da insulina; JNK, amino-terminal c-Jun cinase; MCP, factor de quimioatracção dos monócitos; MG, metilglioxal; NF-kB, factor de transcrição nuclear kappa B; PI-3K, fosfatidilinositol-3-cinase; PKC, proteína cinase C; RAGE, receptor dos produtos avançados de glicação; TNF, factor de necrose tumoral; VEGF, factor de crescimento vascular endotelial.

SUMMARY

Introduction: Adipose tissue hypoxia is commonly observed in obese individuals, what may lead to decreased insulin sensitivity and type 2 diabetes. In diabetics, advanced glycation end products (AGEs) occur in high concentrations and may be involved in insulin resistance through the activation of oxidative and inflammatory pathways.

Objective: Our aim was to evaluate the role of AGEs on insulin signaling in adipose tissue, under hypoxia conditions, regardless of obesity, using a model of ischemia of adipose tissue.

Methods: Methylglyoxal was administered during 8 weeks to Wistar rats (WM; n=8). Four rats were submitted to genital left artery blockage, in order to induce ischemia during 48 hours. The same procedure was performed in normal Wistar rats (W; n=8). In the end, the epididymal adipose tissue was collected and the right one was used as an internal control. We analyzed the systemic fasting levels of glucose, insulin, triglycerides and free fatty acids and tissue levels and activation of proteins involved in insulin signaling.

Results: After ischemia, it was observed an increase of glycemia and insulinemia in both groups (W and WM), as well as an increase in triglycerides in rats treated with methylglyoxal. In these animals, there was a greater reduction of total $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ and phosphorylated Akt levels in ischemic tissue.

Conclusions: Adipose tissue ischemia, which may occur in obesity, may have systemic metabolic consequences, apparently empowered by the accumulation of glycated end products in the tissue. These results suggest that these mechanisms may contribute to metabolic dysfunction associated with the development of type 2 diabetes.

Keywords: adipose tissue, AGEs, insulin resistance, hypoxia, type 2 diabetes

Abbreviations: AGE, advanced glycation end-product; CEL, carboxyethyllysine; DM, diabetes mellitus; DM2, type 2 diabetes; GLUT, glucose transporter; HIF, hypoxia-inducible factor; IKK, inhibitor kappa B kinase; IL, interleukin; IRS, insulin receptor substrate; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MCP, monocyte chemotactic protein; MG, methylglyoxal; NF-kB, nuclear factor kappa B; PI-3K, phosphatidylinositide 3-kinase; PKC, protein kinase C; RAGE, receptor for advanced glycation end-products; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crónica, resultante de alterações morfológicas e funcionais das células β e da diminuição da sensibilidade à insulina. Em 2010, havia 285 milhões de adultos diabéticos no mundo e estima-se que em 2030 poderão ser 439 milhões ¹. A diabetes tipo 2 (DM2) é uma das formas da doença e está relacionada com o excesso de peso ou obesidade e resistência à insulina ².

A insulina, produzida pelas células β dos ilhéus pancreáticos, tem acções importantes no metabolismo dos glícidos, dos lípidos e das proteínas. O seu receptor tem acção de tirosina cinase, levando à fosforilação de resíduos de tirosina do substrato do receptor da insulina (IRS)-1. O IRS-1 fosforilado é responsável por iniciar uma cascata de eventos, que passa pela activação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI-3K) e da Akt (ou proteína cinase B), culminando na translocação do transportador da glicose (GLUT)-4 para a membrana plasmática e na consequente entrada de glicose nas células, sobretudo do tecido adiposo e do músculo. ³

Na DM2 existe um estado crónico de resistência à insulina, cujo desenvolvimento pode estar associado a inflamação e *stress* oxidativo ⁴, pois os diabéticos têm níveis superiores de mediadores inflamatórios e de marcadores de *stress* oxidativo ⁵. A activação de vias inflamatórias e a acção de cinases de serina, incluindo a amino-terminal c-Jun cinase (JNK), o inibidor da cinase kappa B (IKK), a proteína cinase C (PKC), do factor de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), do factor de necrose tumoral (TNF)- α e da interleucina (IL)-6, podem alterar a normal fosforilação de diversas proteínas da via da insulina ^{6,4}. Também o *stress* oxidativo parece induzir a activação de factores de transcrição como o NF-kB e o factor de transcrição induzido pela hipoxia (HIF)-1 que promovem a inactivação da sinalização da insulina ^{5,8}.

Os produtos avançados de glicação (AGEs) resultam de uma reacção de glicosilação não enzimática e irreversível entre açúcares redutores e lípidos oxidados ou proteínas⁹. Os AGEs promovem *stress* oxidativo, alterações morfofuncionais tecidulares e aumento da expressão de mediadores inflamatórios¹⁰. Nos diabéticos, a hiperglicemia promove a formação de AGEs que, em níveis crescentes, contribuem para a fisiopatologia das complicações vasculares da DM^{9,11}. Estes níveis superiores de AGEs podem estar implicados no processo de resistência à insulina¹². No entanto, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a administração de metilglioxal (MG), um importante precursor de AGEs, a um modelo animal normal, não provoca alterações da glicemia, da insulinemia e dos índices sistémicos de resistência à insulina¹³. Outros estudos mostraram que este mesmo precursor provoca uma destabilização do HIF-1, contribuindo para a alteração dos mecanismos de resposta à hipoxia¹⁴. Por outro lado, o receptor dos AGEs (RAGE) é expresso de forma ubíqua, podendo a sua expressão aumentar pela presença dos seus ligandos. A interacção AGE-RAGE leva à activação de vias inflamatórias, como a via do NF- κ B, podendo inactivar a sinalização da insulina¹⁵. Assim, a acumulação de AGEs no tecido adiposo pode contribuir para a resistência à hormona. Unoki (2007) mostrou que a interacção AGE-RAGE diminui a sensibilidade dos adipócitos à insulina e aumenta a produção do factor de quimioatração dos monócitos (MCP)-1, factor que recruta monócitos para o tecido estando, assim, envolvido na potenciação da inflamação do tecido adiposo observada na DM2¹⁶.

O tecido adiposo é constituído por adipócitos, estroma, células endoteliais e do sistema imunitário, entre outras, tendo uma importante função endócrina. Os adipócitos segregam várias adipocitocinas, sendo de destacar a adiponectina, a leptina, o TNF- α , o VEGF, a angiotensina II e várias interleucinas^{17,18}. O normal crescimento e expansão do tecido adiposo é acompanhado por um processo eficaz de angiogénese. Todavia, na maioria dos indivíduos obesos isso não acontece, verificando-se um crescimento rápido dos adipócitos, que não é

acompanhado por uma angiogénese adequada, surgindo hipoxia. A diminuição do oxigénio estimula a angiogénese e a inflamação, sendo esta também um factor estimulador da angiogénese ¹⁹. Neste contexto, a inflamação pode tornar-se crónica e favorecer a resistência à insulina ⁶. Por outro lado, os adipócitos hipertróficos sofrem alterações no seu perfil secretor, com aumento da secreção de MCP-1 e TNF- α e menor produção de adiponectina, resultando na infiltração de macrófagos no tecido adiposo e manutenção do estado inflamatório ^{20, 21}.

O objectivo deste estudo foi avaliar o papel dos AGEs e seus precursores na sinalização da insulina no tecido adiposo em condições de hipoxia, de forma independente da obesidade, utilizando um modelo cirúrgico de diminuição parcial da irrigação sanguínea do tecido adiposo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os sais e solventes orgânicos utilizados possuíam elevado grau de pureza analítica e foram adquiridos à Merck Darmstad – Alemanha, à Sigma-Aldrich – EUA e à Pancreac Química SA-Espanha.

Os anticorpos utilizados foram os seguintes: anticorpo IRS-1, anticorpo Akt, anticorpo Akt-P, anticorpo I κ B α (Cell Signaling, EUA) e anticorpo CEL (TransGenic Inc, Japão).

Modelos animais e procedimentos cirúrgicos

Utilizaram-se ratos Wistar normais com 6 meses de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os ratos foram divididos em dois grupos: (i) um grupo controlo (W; n = 8); e (ii) um grupo de ratos tratados diariamente com metilglioxal, durante 8 semanas (dos 4 aos 6 meses de idade), começando com 50 mg/kg/dia até 75 mg/kg/dia, diluído em água (WM; n = 8). Os animais foram mantidos num ambiente ventilado, com temperatura (22-24°C), humidade (50-60%) e luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas escuro) controladas e com acesso livre a água (pH=5,5) e comida (Dieta standard AO3, SAFE, França). O protocolo experimental foi aprovado pela comissão de ética local e os procedimentos foram realizados por utilizadores credenciados (FELASA).

No final das 8 semanas, induziu-se isquemia através da laqueação da artéria genital esquerda, que irriga o tecido adiposo epididimal, a 4 ratos de cada grupo. Os outros 4 foram mantidos como controlos. A isquemia foi mantida durante 48 horas e os tecidos adiposos epididimais esquerdo (isquémico: i) e direito (tecido controlo: c) foram recolhidos e armazenados a -80 °C.

Num conjunto diferente de ratos (n=3), sem qualquer tratamento, foi realizado o mesmo procedimento cirúrgico e, 48h depois, foi administrado por via intravenosa (jugular) o corante Evans Blue, com recolha do tecido adiposo 5 minutos depois. Este corante liga-se à albumina e constitui um marcador histológico de irrigação; permite avaliar a percentagem de perda de irrigação no tecido, em relação ao controlo interno e ao tecido sem corante.

Parâmetros sanguíneos

No final do tratamento, 48 horas após a cirurgia, determinou-se, no sangue da veia da cauda, a glicemia, a hemoglobina glicada (HbA1c) e os triglicérideos em jejum (6 horas), através de analisadores portáteis (Bayer, Siemens e Roche, respectivamente), nos grupos W e WM. Os animais foram seguidamente anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/kg, i.m., Parke-Davis, Ann Arbor, EUA) e cloridrato de clorpromazina (2,65 mg/kg, i.m., Laboratórios Vitória, Portugal) e foram recolhidas amostras de sangue, por punção cardíaca, para determinação dos ácidos gordos livres e da insulina no plasma. Para a separação do plasma, foram utilizados tubos BD Vacutainer K3E, com 5,4 mg de EDTA (BD Vacutainer, Reino Unido); o sangue foi centrifugado a 3500 rpm, 10 minutos, a 4 °C, e o plasma foi aliquoteado e armazenado a -80 °C.

Os níveis plasmáticos de ácidos gordos foram determinados por uma técnica colorimétrica (Half Micro-Test, Roche). Os níveis plasmáticos de insulina foram determinados por ELISA, utilizando um kit comercial (Insulin ELISA Kit, Mercodia, Suécia).

Western Blott

Amostras de tecido adiposo (300 mg) foram homogeneizadas em tampão de lise (tabela 1) e centrifugadas a 14 000 g, 20 minutos, 4 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados novamente e a concentração de proteína foi determinada usando o método

BCA. As amostras foram separadas em gel de acrilamida desnaturante e transferidas para membranas PVDF. As membranas foram bloqueadas com solução TBST (tabela 1) suplementada com 5% BSA. A incubação das membranas com os respectivos anticorpos primários (Akt, Akt-P, I κ B α , IRS-1 e CEL) foi feita durante a noite, a 4 °C, e durante 2 horas, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários.

As membranas foram incubadas com ECF e ECL (Bio-Rad, EUA) e reveladas com o sistema Typhoon (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) e sistema Versadoc (Bio-Rad, EUA), respectivamente. A análise das membranas foi feita com recurso ao software Image Quant®, Molecular Dynamics, EUA.

Histologia

Após a colheita, uma parte do tecido adiposo foi armazenada em formol e incluída em parafina, de onde foram obtidas secções de 4 μ m. A acumulação de glicoconjugados foi avaliada utilizando a técnica do ácido periódico de Schiff (PAS).

Análise estatística

Os resultados estão referenciados como média \pm erro padrão da média (epm).

As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram avaliadas através do método Kruskal-Wallis. $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

Indução de glicação no tecido adiposo

Nos ratos tratados com MG observou-se um aumento dos AGEs, especificamente do CEL que é um produto formado directamente a partir do MG (Figura 1 A). Nos mesmos animais verificou-se também um aumento de material PAS positivo (glicoconjugados) (Figura 1 B).

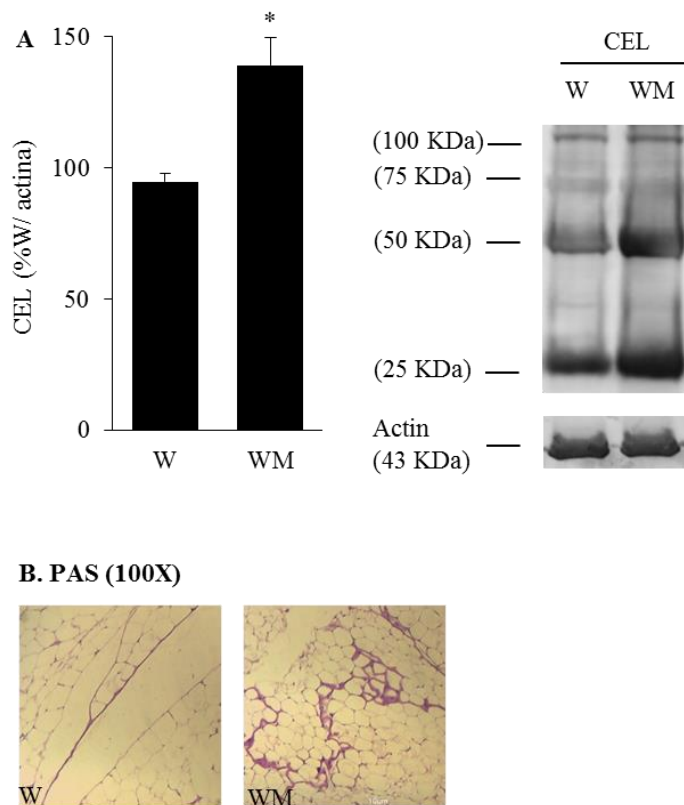


Figura 1: Níveis de CEL no tecido adiposo (A). Histologia do tecido adiposo com marcação PAS (200x) (B).

W, ratos Wistar controlo; WM, ratos Wistar tratados com MG. * diferente de W, $p < 0,05$.

Diminuição da irrigação do tecido adiposo

A diminuição da irrigação sanguínea do tecido adiposo submetido a isquemia foi confirmada através da injeção do contraste Evans Blue. O tecido adiposo epididimal direito (sem laqueação do vaso) foi considerado o controlo positivo. Como controlo negativo, foi utilizado o tecido adiposo epididimal de um rato sem administração do corante. A laqueação da artéria genital esquerda (Isq 48h) provocou uma diminuição da irrigação sanguínea de cerca de 60% da irrigação normal (Figura 2).

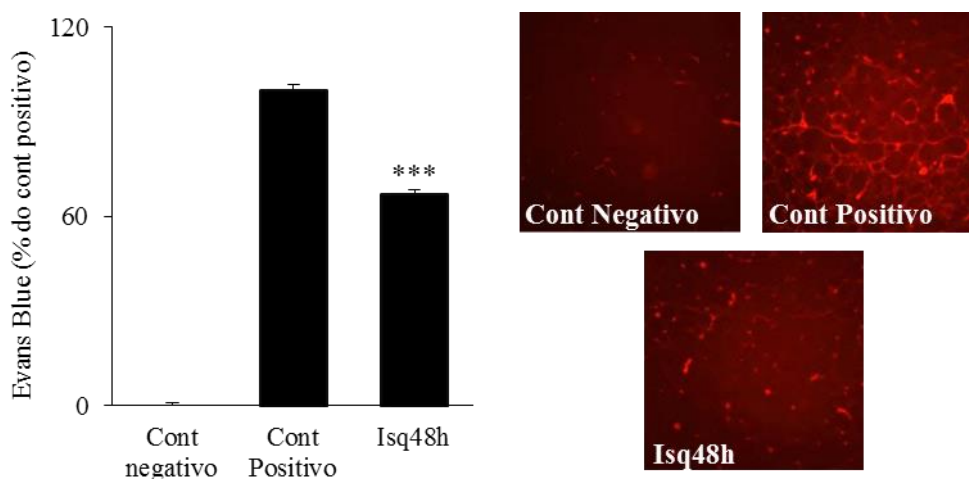


Figura 2: Imagens de imunohistoquímica do tecido adiposo, 5 minutos após a injeção de Evans Blue. Controlo negativo: sem injeção de corante. Controlo positivo: tecido adiposo epididimal direito, correspondente a 100% da irrigação sanguínea. Isq48h: tecido adiposo epididimal esquerdo após o período de isquemia. *** diferente de Controlo positivo, $p < 0,001$.

Parâmetros sistêmicos:

A administração de MG a ratos Wistar normais não provocou alterações do peso e da HbA_{1c} (Tabela 2).

Tabela 1: Peso e hemoglobina glicada.

Parâmetro	W (n=8)	WM (n=8)
Peso (g)	429,6 ± 17,2	439,5 ± 17,6
HbA _{1c} (%)	3,6 ± 0,1	3,6 ± 0,0

W, ratos Wistar; WM, ratos Wistar tratados com MG.

Após 48h de isquemia, registou-se um aumento da glicemia e da insulinemia em jejum, tanto nos ratos W, como nos ratos WM (Figura 3 A, B). Verificou-se também um aumento dos ácidos gordos livres nos ratos WM, que foi mantido após a diminuição da irrigação (WM 48h), bem como dos triglicerídeos, nos mesmos ratos, 48 horas após diminuição da irrigação (Figura 3 C, D).

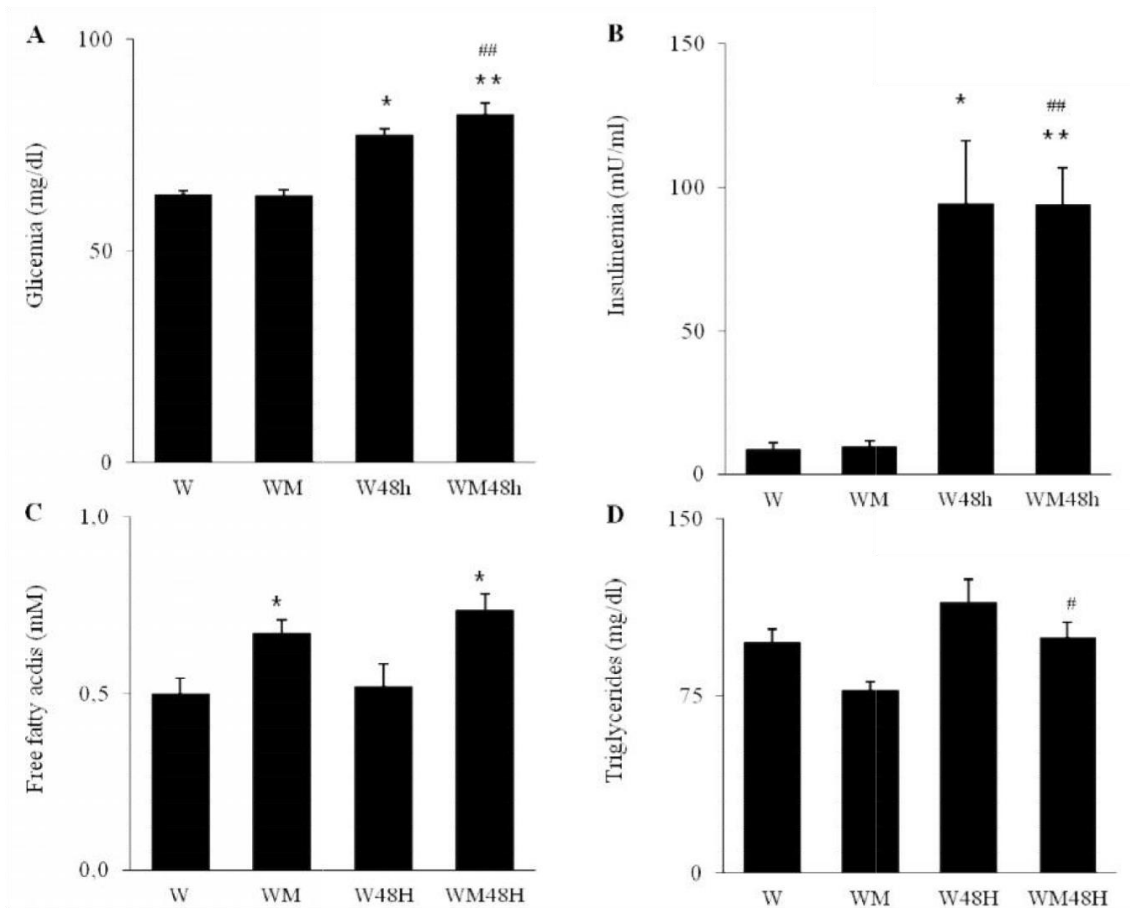


Figura 3: Glicemia (A), insulinemia (B) e níveis sanguíneos de ácidos gordos livres (C) e triglicerídeos (D).

W, ratos Wistar; WM, ratos Wistar tratados com MG; W48H, ratos W com isquemia de 48h; WM48H, ratos WM com isquemia de 48h. * diferente de W. # diferente de WM. 1 Símbolo $p < 0,05$; 2 símbolos $p < 0,01$; 3 símbolos $p < 0,001$.

I κ B α , Akt e IRS-1 no tecido adiposo

Não se verificaram diferenças significativas entre os ratos W e WM. No entanto, após um período de 48h de isquemia, a degradação do I κ B α aumentou significativamente no tecido adiposo isquêmico dos ratos WM (Figura 4 A). Os níveis totais de Akt mantiveram-se inalterados em todos os grupos e a sua activação diminuiu apenas no tecido isquêmico dos ratos WM. (Figura 4 B).

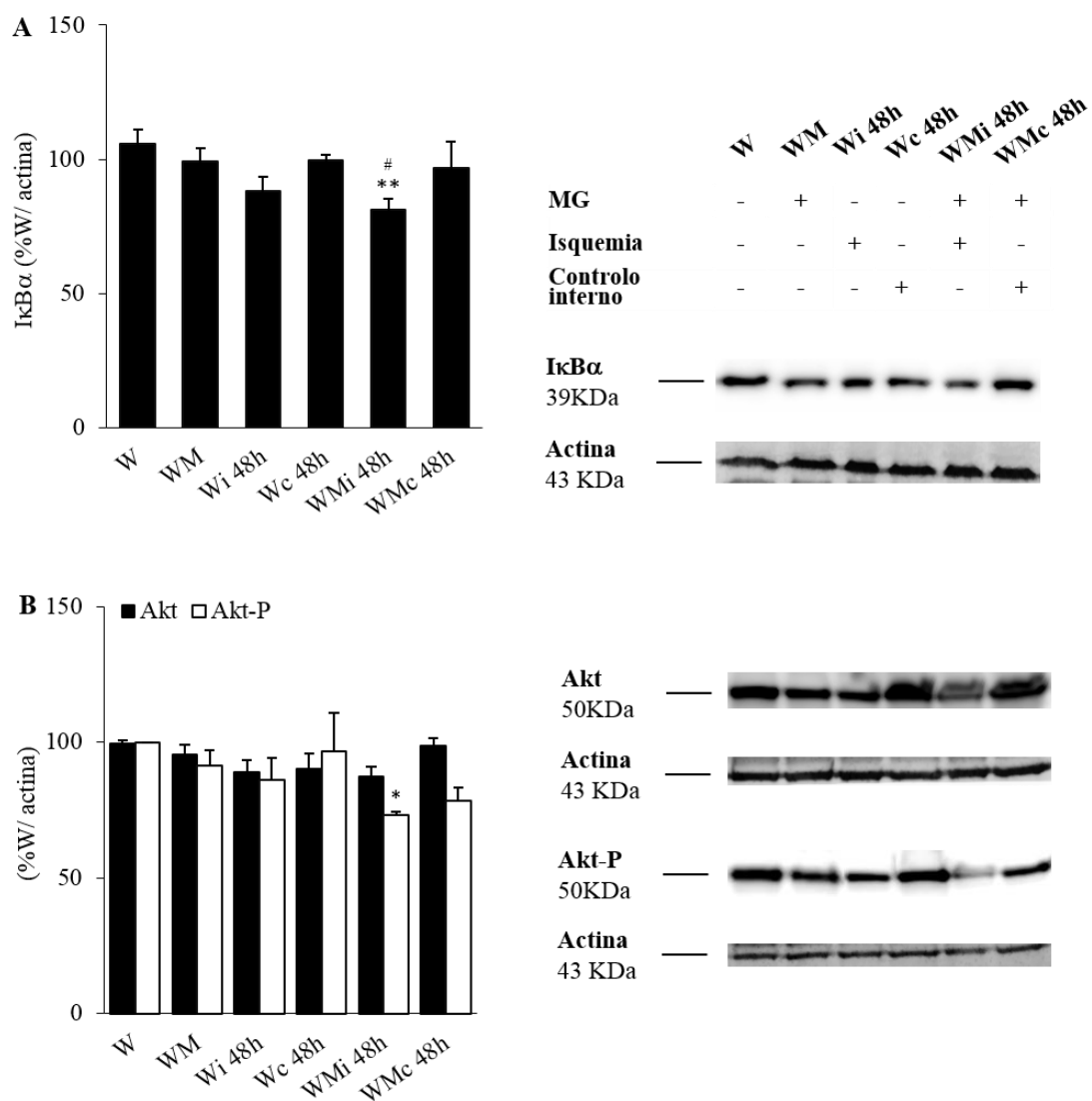


Figura 4: Níveis no tecido adiposo de IκBα (A) e de Akt total e fosforilada (B), com *Western Blotting* representativo.

W, ratos Wistar; WM, ratos Wistar tratados com MG; Wi, tecido adiposo isquêmico dos ratos W; Wc, controlo interno do tecido adiposo dos ratos W; WMi, tecido adiposo isquêmico dos ratos WM; WMc controlo interno do tecido adiposo dos ratos WM. * diferente de W. # diferente de WM. 1 Símbolo p <0,05; 2 símbolos p <0,01.

Em condições basais, o IRS-1 apresentou níveis idênticos nos ratos W e WM. No tecido com isquemia de 48h, verificou-se uma aparente diminuição dos níveis totais de IRS-1, mais evidente nos ratos tratados com MG, mas que não foi estatisticamente significativa. Nos tecidos controlo interno dos ratos W e WM, os níveis de IRS-1 mantiveram-se idênticos aos dos controlos (Figura 5).

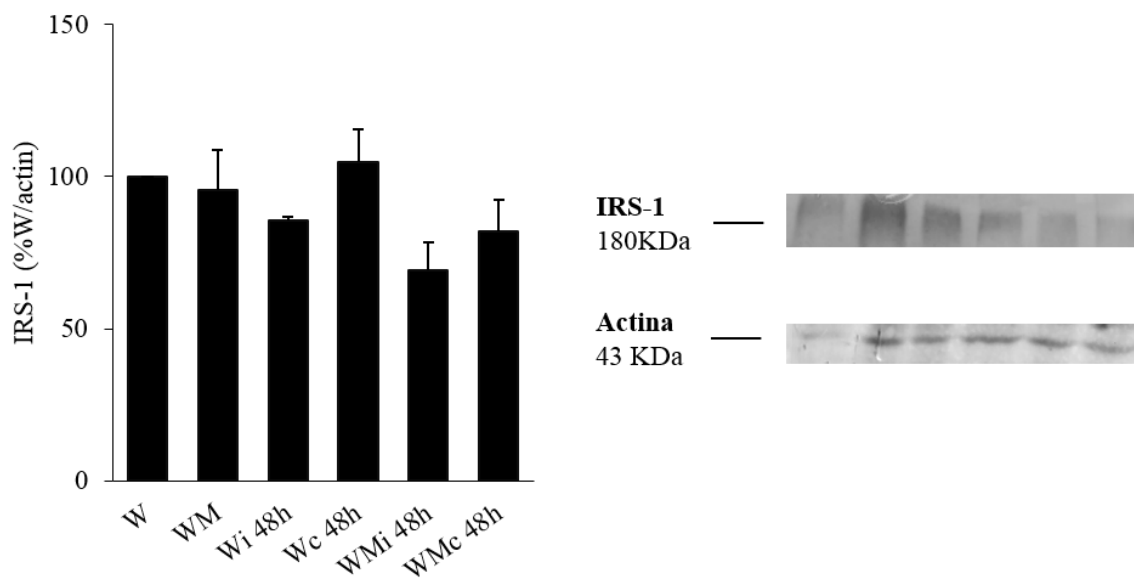


Figura 5: Níveis de IRS-1 no tecido adiposo, com Western Blotting representativo.

W, ratos Wistar; WM, ratos Wistar tratados com MG; Wi, tecido adiposo isquémico dos ratos W; Wc, controlo interno do tecido adiposo dos ratos W; WMi, tecido adiposo isquémico dos ratos WM; WMc controlo interno do tecido adiposo dos ratos WM.

DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se o papel dos AGEs na via canónica de sinalização da insulina no tecido adiposo, independentemente de outras alterações observadas na obesidade. Para tal, utilizou-se um modelo animal não obeso (ratos Wistar) e administrou-se MG durante 8 semanas. A isquemia do tecido adiposo epididimal foi induzida através de laqueação da artéria genital esquerda e confirmou-se a diminuição da irrigação sanguínea através do corante Evans Blue. A isquemia do tecido adiposo condiciona um estado de hipoxia, que é frequentemente encontrado nos indivíduos obesos e está envolvido na disfunção do tecido adiposo^{6, 13}. A administração de MG aumentou a produção de AGEs, nomeadamente de CEL, e induziu uma deposição acentuada de glicoconjugados no tecido adiposo. No entanto, não se registaram alterações no perfil glicémico, nem na insulinemia e trigliceridemia, contrariamente ao observado com os ácidos gordos livres.

As alterações observadas na glicemia e na insulinemia surgem nos animais W e WM após a isquemia. O aumento da insulinemia surge como uma compensação ao aumento da glicemia, consequência do compromisso da metabolização da glicose no tecido isquémico, e evidencia a importância de uma só região de tecido adiposo para o metabolismo sistémico. Quanto ao perfil lipídico, notou-se que, após a isquemia, os ratos WM têm níveis mais elevados de ácidos gordos livres e triglicéridos, podendo este facto estar relacionado com a morte de adipócitos e consequente libertação de lípidos para a corrente sanguínea^{13, 21}. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos realizados pelo nosso grupo^{13, 22} e por outros investigadores¹².

Apenas nos ratos tratados com MG e submetidos a isquemia do tecido adiposo foram observadas alterações dos parâmetros tecidulares. O aumento da degradação do I κ B α (inibidor do NF- κ B) sugere que ocorre a activação de vias inflamatórias em resposta à

isquemia, indo ao encontro dos resultados obtidos nos trabalhos de Ye (2009) e Matafome (2012)^{6, 13}.

Em relação à Akt, verificou-se uma diminuição dos níveis da forma fosforilada no tecido adiposo, sobretudo nos ratos sujeitos a administração de MG. Essa diminuição da activação da Akt ocorre ao mesmo tempo que a glicemia e insulinemia estão mais aumentadas, podendo sugerir uma diminuição local da sensibilidade à insulina e desenvolvimento de insulino-resistência.

Quanto ao IRS-1, registou-se também uma diminuição dos níveis totais no tecido isquémico (apesar dos resultados não serem estatisticamente significativos), o que poderá ser explicado pela activação das vias inflamatórias, pois as mesmas vias podem promover a fosforilação em resíduos de serina inactivando, assim, o IRS-1 e aumentando a sua degradação no proteossoma^{23, 24, 25}. Provavelmente, se o período de isquemia fosse maior, conseguir-se-ia verificar níveis de IRS-1 significativamente menores. A quantificação da forma fosforilada do IRS-1, também seria útil para corroborar essa hipótese. Estes dados também se relacionam com a menor activação da Akt, uma vez que na cadeia de sinalização da insulina, a fosforilação em resíduos de tirosina do IRS-1 ocorre antes da fosforilação da Akt. Assim, interferindo na função do IRS-1, condiciona-se toda a restante cascata de eventos, culminando na menor entrada de glicose na célula e promovendo a resistência à acção da insulina²⁵.

Dhar e seus colegas (2011) estudaram os efeitos da administração crónica de MG em ratos Sprague-Dawley (libertação continuada de MG durante 28 dias, através de uma mini-bomba colocada subcutaneamente). Verificaram que o aumento dos níveis de MG condiciona alterações na tolerância à glicose, aumento do NF-kB e menor fosforilação do IRS-1 no tecido adiposo²⁶.

Um outro estudo, conduzido por Jia (2007), teve como objectivo a avaliação dos efeitos do MG na via de sinalização da insulina. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley alimentados com frutose, um precursor do MG, durante 9 semanas. Observaram um aumento dos níveis sanguíneos de triglicérides e insulina e insulino-resistência, paralelamente ao aumento dos níveis séricos de MG. Trataram também uma linha celular de adipócitos (3T3-L1) com MG; verificaram uma diminuição não significativa do IRS-1 e sugeriram também o envolvimento do MG na resistência à insulina ¹².

As diferentes condições experimentais poderão justificar a divergência de resultados. O nosso protocolo baseia-se na administração de MG em doses que induzem uma situação semelhante à situação diabética ¹³.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a diminuição da irrigação do tecido adiposo conduz ao aumento da glicemia e compensatoriamente da insulinemia, enquanto a glicação afecta particularmente os ácidos gordos livres. Após a isquemia do tecido adiposo, ocorrem alterações metabólicas importantes e favorece-se a inflamação, conduzindo a alterações na via de sinalização da insulina e diminuição da sensibilidade à hormona.

A hipóxia do tecido adiposo, que pode ocorrer na obesidade, pode ter repercussões metabólicas sistémicas, aparentemente potenciadas pela acumulação de produtos glicados no tecido. Estes resultados sugerem que estes mecanismos podem estar implicados na disfunção metabólica associada ao desenvolvimento de DM2.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e à Fundação Portuguesa de Ciência e Tecnologia, por permitir e financiar este trabalho.

Ao Serviço de Anatomia Patológica dos CHUC, nomeadamente à técnica Ilda Simões, pela ajuda na histologia.

Ao Doutor Paulo Matafome pela orientação, disponibilidade e pelos ensinamentos essenciais à realização deste trabalho.

À Prof^a Doutora Raquel Seíça pelo apoio científico, assim como críticas e sugestões.

Ao Tiago por toda a ajuda no laboratório, pela paciência e pela amizade.

Ao Sr. Simões pela simpatia e pelo apoio.

Aos meus amigos, em especial à Carolina, Leila, Micaela e Daniela, por todos os momentos de alegria, pelas folias, pelo apoio nos momentos de tristeza e por me escutarem.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo apoio incondicional, por acreditarem sempre em mim, por todos os valores e ensinamentos de vida, pela sua presença mesmo na distância.

Bibliografia:

1. Shaw J.E., Sicree R.A., Zimmet P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010; 87(1):4-14.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2013; 36 Suppl 1:S67-74.
3. Matafome P., Monteiro P., Nunes E., Louro T., Amaral C., Moedas A. R., & al. Therapeutic association of atorvastatin and insulin in cardiac ischemia: Study in a model of type 2 diabetes with hyperlipidemia. *Pharmacol Res.* 2008; 58 (3-4): 208-14.
4. Wellen K. E., Hotamisligil G. S. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005; 115 (5): 1111-9.
5. Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine* 2011; 50: 567-575.
6. Ye J. Emerging Role of Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Insulin Resistance. *Int J Obes (Lond).* 2009; 33 (1): 54-66.
7. Kim J. K. Inflammation and insulin resistance: an old story with new ideas. *Korean Diabetes J.* 2010; 34(3):137-45.
8. Girgis C. M., Cheng K., Scott C. H., Gunton J. E. Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2012; 23(8):372-80.
9. Goldin A., Beckman J. A., Schmidt A.M., Creager M. A. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation.* 2006; 114 (6): 597-605.
10. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes.* 2005; 54 (6): 1615-25.
11. Vlassara H., Palace M.R. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002; 251(2):87-101.
12. Jia X., Wu L. Accumulation of endogenous methylglyoxal impaired insulin signaling in adipose tissue of fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem.* 2007; 306(1-2):133-9.
13. Matafome P. et al. Methylglyoxal causes structural and functional alterations in adipose tissue independently of obesity. *Arch Physiol Biochem.* 2012; 118(2):58-68.
14. Bento C., Fernandes R., Matafome P., et al. Methylglyoxal-induced imbalance in the ratio of vascular endothelial growth factor to angiopoietin 2 secreted by retinal pigment epithelial cells leads to endothelial dysfunction. *Exp Physiol.* 2010; 95(9):955-70.

15. Negre-Salvayre A., Salvayre R., Audebert N., Pamplona R., Portero-Oti M. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(12):3071-109.
16. Unoki H., Bujo H., Yamagishi S., Takeuchi M., Imaizumi T., Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; 76(2):236-44.
17. Galic S. et al. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 316(2):129-39.
18. Rutkowski J. M., Davis K. E., Scherer P. E. Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J*. 2009; 276(20):5738-46.
19. Maury E., Brichard S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 314(1):1-16.
20. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav*. 2008; 94(2):206-18.
21. Guilherme A., Virbasius J. V., Puri V., Czech M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(5):367-77.
22. Rodrigues T., Matafome P., Seiça R. Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply. *Arch Physiol Biochem*. 2013
23. Draznin B. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85. *Diabetes*. 2006 vol. 55 no. 8: 2392-2397.
24. Johnston A. M., Pirola L, Van Obberghen E. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett*. 2003; 546(1):32-6.
25. Gual P. et al. Positive and negative regulation of insulin signalling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005; 87(1):99-109.
26. Dhar A, Dhar I, Jiang B, Desai KM, Wu L. Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. *Diabetes*. 2011; 60(3):899-908.