

Lara Raquel Sopas Azul

O PAPEL DA INFLAMAÇÃO NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL ASSOCIADA À DIABETES TIPO 2: ESTARÁ O TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR ENVOLVIDO?

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O papel da inflamação na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2: estará o tecido adiposo perivascular envolvido?

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

Lara Raquel Sopas Azul
2017

“O tempo e a paciência são os mais fortes de todos os guerreiros.” – Adaptado, Liev Tolstói

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a todos os que me acompanharam na concretização desta etapa.

Agradeço profundamente à minha orientadora, Professora Doutora Cristina Sena, pela oportunidade e apoio, amizade, compreensão e ajuda disponibilizada durante este ano letivo, além de ter sido fundamental para a realização deste trabalho, contribuiu para a minha aprendizagem e evolução profissional.

Ao Professor Doutor Ângelo Tomé, o meu orientador interno, agradeço-lhe por todo o apoio, amizade e simpatia.

Agradeço sinceramente à Professora Doutora Raquel Seíça por toda a disponibilidade, amizade e simpatia.

À Adriana, Ana e Margarida, as minhas companheiras do quarteto fantástico, agradeço por todos os bons momentos passados no laboratório, e por estarem sempre disponíveis para me ajudar e motivar.

Ao Paulo, Tiago, Liliana, Daniela, Ana Sofia e Inês, pela boa disposição e diversão aos almoços.

Aos meus pais e avós, agradeço especialmente por serem os meus heróis e o meu porto de abrigo, dão-me a força e coragem que preciso e a eles devo tudo aquilo que sou. Obrigada por nunca me deixarem desistir e compreenderem todas as minhas questões.

À Daniela, Laura, Diana, Mónica, Pedro e Fábio, os irmãos que Coimbra me deu, agradeço por toda a amizade, nos bons e maus momentos, sempre presentes para me alegrarem e não me deixarem desistir. À Andrea, a minha madrinha de curso, um obrigado especial pela amizade e por me ter ensinado a viver Coimbra, a adaptar-me e vencer.

À Quantunna – Tuna Mista da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, que durante o meu percurso académico se tornou a minha segunda família e me ensinou que o percurso pela universidade pode ser mais do que uma simples passagem.

Às entidades financiadoras do projeto: FCT (PTDC/BIM-MET/4447/2014) e COMPETE (POCI-01-0145-FEDER-016784).

Sem eles, não teria sido possível. Obrigada, bem hajam!

Lara Raquel Sopas Azul

Cofinanciado por:



ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABELAS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diabetes tipo 2	2
1.2. Função Endotelial	3
1.2.1. Óxido Nítrico	4
1.2.1.1. Produção de Óxido Nítrico	5
1.2.2. Disfunção endotelial e mecanismos associados	6
1.3. <i>Stress</i> Oxidativo.....	7
1.3.1. Espécies Reativas de Oxigênio	8
1.3.2. Desacoplamento da eNOS	9
1.4. Resistência à insulina.....	10
1.5. Dieta rica em gorduras	13
1.6. Tecido Adiposo Perivascular	16
1.6.1. Produção de adipocinas	18
1.6.1.1. Adiponectina.....	18
1.6.2. Mecanismos associados ao tecido adiposo perivascular	19
1.6.3. Tecido adiposo perivascular e as doenças cardiovasculares.....	20
1.7. Propagermanio	23
1.8. Objetivos.....	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. Materiais	29

2.1.1. Reagentes químicos e imunológicos.....	29
2.2. Modelos animais e tratamentos.....	30
2.2.1. Peso corporal e glicemia.....	31
2.2.2. Prova de tolerância à glicose e prova de tolerância à insulina.....	31
2.2.3. Determinação dos níveis sistêmicos de colesterol total e triglicerídeos....	32
2.2.4. Colheita de sangue.....	32
2.2.5. Sacrifício dos animais e recolha de órgãos.....	32
2.2.6. Estudos Isométricos.....	33
2.2.7. Determinação dos níveis de hemoglobina A1c.....	36
2.2.8. Apresentação dos resultados e análise estatística.....	36
3. RESULTADOS.....	37
3.1. Peso corporal e glicemia.....	38
3.2. Hemoglobina A1c.....	41
3.3. Prova de tolerância à glicose e prova de tolerância à insulina.....	41
3.4. Perfil lipídico dos animais: níveis sistêmicos de colesterol total e de triglicerídeos.....	45
3.5. Índice de Lee.....	46
3.6. Estudos funcionais.....	47
3.6.1. Efeito do propagermanio no relaxamento dependente do endotélio.....	47
3.6.2. Efeito do propagermanio no relaxamento dependente do endotélio com adição de L-NAME.....	48
3.6.3. Efeito do propagermanio no relaxamento dependente do endotélio com adição de L-NAME e indometacina.....	49
3.6.4. Efeito do propagermanio no relaxamento independente do endotélio.....	51
3.6.5. Efeito do tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio.....	52
3.6.6. Efeito do tecido adiposo perivascular na contração do endotélio em resposta à endotelina-1.....	53

3.6.7. Efeito do propagermanio no tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio	54
3.6.8. Efeito do propagermanio no tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio em animais alimentados com dieta gorda	55
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÃO.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da parede de uma artéria.....	3
Figura 2: Prostanóides derivados da ciclooxigenase.....	4
Figura 3: Produção de NO a partir de L-arginina e oxigênio (O ₂) pela eNOS, juntamente com tetrahydrobiopterina (BH ₄) e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (fosfato) (NADPH).....	5
Figura 4: Desequilíbrio redox. Transferência de elétrons para o O ₂ forma o superóxido, agravando a disfunção endotelial e o <i>stress</i> oxidativo	9
Figura 5: Evolução da resistência à insulina e consequência da disfunção das célulasβ11	
Figura 6: Cascata de sinalização de insulina e desregulação em estados de resistência à insulina	12
Figura 7: <i>Crosstalk</i> entre o PVAT e a vasculatura.....	16
Figura 8: Diagrama esquemático da disfunção do tecido adiposo perivascular	21
Figura 9: Estrutura molecular do propagermanio	24
Figura 10: Grupos experimentais	30
Figura 11: Esquema de montagem das artérias com e sem tecido adiposo perivascular nas câmaras de órgãos individuais	33
Figura 12: Peso corporal dos animais desde os 3 meses de idade até aos 8 meses e desde os 5 meses de idade até aos 8 meses e efeito da dieta gorda no peso corporal dos animais diabéticos sujeitos à dieta gorda relativamente aos animais diabéticos controlo sujeitos à dieta padrão.....	38
Figura 13: Glicemia após jejum de 16h no período inicial (I), antes da dieta (ID), antes da terapia (IT), e no final (F) e efeito da dieta gorda e da terapia nos níveis de glicose em jejum, nos diferentes grupos em estudo.....	40
Figura 14: Glicemia após jejum de 6h aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos em estudo.....	40
Figura 15: Prova de tolerância à glicose intraperitoneal aos 3 meses de idade. Variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 60, 120 minutos) e a respetiva área abaixo da curva (AUC)	42

Figura 16: Prova de tolerância à glicose intraperitoneal aos 5 meses de idade. Variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 60, 120 minutos) e a respectiva área abaixo da curva (AUC)	43
Figura 17: Prova de tolerância à glicose intraperitoneal final aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos em estudo. Variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 60, 120 minutos) e a respectiva área abaixo da curva (AUC)	43
Figura 18: Prova de tolerância à insulina aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos em estudo. Variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 15, 30, 45, 60, 120 minutos) e a respectiva área abaixo da curva (AUC)	45
Figura 19: Curva dose-resposta à acetilcolina	48
Figura 20: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME	49
Figura 21: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME e de indometacina.....	50
Figura 22: Curva dose-resposta ao nitroprussiato de sódio	52
Figura 23: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença e ausência de tecido adiposo perivascular em animais W e GK C0	53
Figura 24: Curva dose-resposta à endotelina-1 na presença e ausência de tecido adiposo perivascular.....	54
Figura 25: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença e ausência de tecido adiposo perivascular em animais W, GK C0 e GK CT	55
Figura 26: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença e ausência de tecido adiposo perivascular em animais W, GK H0 e GK HT	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes e produtos mais relevantes no trabalho	29
Tabela 2: Composição da dieta padrão usada neste trabalho	29
Tabela 3: Composição da dieta gorda usada neste trabalho	29
Tabela 4: Curva dose-resposta à ACh	35
Tabela 5: Curva dose-resposta à ET-1	35
Tabela 6: Curva dose-resposta ao SNP	35
Tabela 7: Peso corporal final aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos de animais em estudo	39
Tabela 8: Hemoglobina A1c nos diferentes grupos em estudo	41
Tabela 9: Níveis sistêmicos de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), correspondentes ao período inicial (I), antes da dieta (ID), antes da terapia (IT), e final (F), nos diferentes grupos em estudo	46
Tabela 10: Índice de Lee nos diferentes grupos em estudo	46

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ACh	Acetilcolina
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AMPK	Cinase de adenosina monofosfato
AR	Aldose-redutase
ATP	Trifosfato de adenosina
AUC	Área abaixo da curva
BH₄	Tetrahydrobiopterina
Ca²⁺	Cálcio
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CCR2	Recetor de quimiocinas C-C Tipo 2
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CO₂	Dióxido de carbono
COX1	Ciclooxigenase 1
COX2	Ciclooxigenase 2
DL50	Dose letal mediana
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
e.p.m.	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina 1
FA	Ácidos gordos
FFA	Ácidos gordos livres
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GK	Goto-Kakizaki
GLUT2	Transportador de glicose 2
GLUT4	Transportador de glicose 4
GPI	Proteína glicosilfosfatidilinositol
GSH	Glutathiona

GSSG	Glutationa oxidada
HbA1c	Hemoglobina A1c
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFD	Dieta rica em gorduras
IDH	Isocitrato desidrogenase
IFNs	Interferões
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
K⁺	Potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	N ^o Nitro-L-arginina metil éster
M1	Macrófagos pró-inflamatórios
M2	Macrófagos anti-inflamatórios
MAPK	Cinase das proteínas ativadoras da mitogénese
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADP⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato oxidado
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (fosfato)
NK	Células <i>natural killers</i>
NO	Óxido nítrico ou monóxido de azoto
NOS	Sintase de monóxido de azoto ou óxido nítrico sintase
O₂	Oxigénio molecular
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogénio 1
PGD₂	Prostaglandina D2
PGE₂	Prostaglandina E2
PGF₂α	Prostaglandina F2α
PGI₂	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina

PI-3K	Fosfatidilinositol cinase na posição 3
PTGIP	Prova de tolerância à glicose intraperitoneal
PTI	Prova de tolerância à insulina
PTP-1B	Proteína fosfo-tirosina fosfatase
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
PVAT	Tecido adiposo perivascular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFA	Ácidos gordos saturados
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TG	Triglicerídeos
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TP	Recetor acoplado à proteína G das plaquetas
TXA2	Tromboxano A2
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VSMC	Células vasculares do músculo liso
W	Wistar

RESUMO

A diabetes tipo 2 é um distúrbio metabólico multifatorial que se caracteriza por uma deficiência absoluta ou relativa da insulina associada ao fator insulino-resistência, o que conduz a complicações vasculares e a sua prevalência está a aumentar em todo o mundo. Esta patologia surge associada à obesidade e há evidências de uma relação recíproca entre a resistência à insulina e a disfunção endotelial. A função do endotélio vascular encontra-se comprometida nas doenças cardiovasculares, na obesidade e na diabetes tipo 2, o que leva à disfunção endotelial que se traduz na incapacidade do endotélio manter a homeostase vascular e é caracterizada principalmente pela biodisponibilidade insuficiente de óxido nítrico (NO).

O tecido adiposo perivascular (PVAT) liberta uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas que têm influência na vasculatura. Em condições normais, o PVAT exerce funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias, porém, na obesidade, devido à inflamação do PVAT, caracterizada pelo desequilíbrio entre as células pró e anti-inflamatórias, há indução da secreção anormal de adipocinas e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS).

O propagermanio possui uma potente atividade moduladora imune associada a propriedades anti-inflamatórias e sabe-se que este anti-inflamatório inibe o recetor de quimiocinas C-C 2 (CCR2) e suprime a infiltração de macrófagos/monócitos. Contudo, não existe nenhum estudo a abordar as potencialidades deste composto em termos vasculares e perivasculares. Este trabalho teve como objetivo estudar o papel do tecido adiposo perivascular e a eficácia terapêutica do propagermanio na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2, bem como o seu impacto perivascular.

Para isso foram avaliados dois modelos animais diferentes: como modelo de diabetes tipo 2, ratos machos Goto-Kakizaki (GK) e como modelo controlo, ratos machos saudáveis Wistar (W). Os ratos GK foram divididos em quatro grupos de estudo: grupo controlo (GK C0); grupo controlo tratado com 50 mg/kg de propagermanio (GK CT); grupo de animais alimentados com uma dieta rica constituída por 50 Kcal % de gordura (GK H0) e ainda um grupo de animais alimentados com uma dieta rica em gordura e tratado com 50mg/kg de propagermanio (GK HT). O propagermanio foi administrado por via oral, durante 3 meses. Foram avaliados diversos parâmetros *in vivo* como o peso corporal, o comprimento nasoanal (para o cálculo do Índice de Lee), o perfil lipídico (níveis sistémicos de colesterol total e triglicédeos), os

níveis de glicose em jejum, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (através de provas de tolerância à glicose e à insulina, respectivamente). Ao nível vascular foi estudado *ex vivo* o relaxamento dependente e independente do endotélio e a contração do endotélio em resposta à endotelina-1. Por fim, foram calculados os níveis de hemoglobina A1c.

Verificámos que a administração do propagermanio, por via oral, não interferiu no peso dos animais e não alterou o índice de Lee, no entanto, melhorou os níveis da glicose em jejum e a resistência à insulina, não alterou os níveis de colesterol total e triglicéridos, não teve um efeito significativo na prova de tolerância à glicose intraperitoneal, melhorou a sensibilidade à insulina e a disfunção endotelial e recuperou o efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular.

A presença do propagermanio melhorou a disfunção endotelial e recuperou o fenótipo vasodilatador do tecido adiposo perivascular muito provavelmente devido à sua ação anti-inflamatória. Assim, o tecido adiposo perivascular está envolvido na regulação da função endotelial e surge como um potencial alvo terapêutico para a disfunção vascular relacionada com a diabetes tipo 2.

Palavras-Chave: anti-inflamatório, diabetes tipo 2, disfunção endotelial, inflamação, tecido adiposo perivascular

ABSTRACT

Type 2 diabetes is a multifactorial metabolic disorder characterized by an absolute or relative insulin deficiency associated with insulin resistance factor, leading to vascular complications and its prevalence is increasing worldwide. This pathology is associated with obesity and there is evidence of a reciprocal relationship between insulin resistance and endothelial dysfunction. Vascular endothelial function is compromised in cardiovascular diseases, obesity and type 2 diabetes, leading to endothelial dysfunction resulting in the inability of the endothelium to maintain vascular homeostasis and is mainly characterized by insufficient bioavailability of nitric oxide (NO).

Perivascular adipose tissue (PVAT) releases a wide variety of biologically active molecules that have influence on the vasculature. In normal conditions, PVAT exerts vasodilatory and anti-inflammatory functions, but in obesity due to inflammation of PVAT, characterized by imbalance between pro and anti-inflammatory cells, there is induction of abnormal adipokine secretion and reactive oxygen species (ROS) production.

Propagermanium has potent immune modulating activity associated with anti-inflammatory properties and it is known that this anti-inflammatory inhibits the C-C 2 chemokine receptor (CCR2) and suppresses macrophage/monocyte infiltration. However, there is no study addressing the potential of this compound at vascular and perivascular level. This work aimed to study the role of perivascular adipose tissue, the therapeutic efficacy of propagermanium in endothelial dysfunction associated with type 2 diabetes and its perivascular impact.

Two different animal models were evaluated: as a type 2 diabetes model, Goto-Kakizaki (GK) male rats and as a control model, Wistar (W) healthy male rats. GK rats were divided into four study groups: control group (GK C0); group treated with 50 mg/kg of propagermanium (GK CT); group of animals fed a rich diet consisting of 50 Kcal% of fat (GK H0) and a group of animals fed a high fat diet and treated with 50 mg/kg of propagermanium (GK HT). The propagermanium was given orally for 3 months. Several in vivo parameters such as body weight, nasoanal length (for the Lee Index), lipid profile (total cholesterol and triglyceride systemic levels), fasting glucose levels, glucose tolerance and insulin sensitivity (through glucose and insulin tolerance tests, respectively). At the vascular level, independent and endothelium-dependent

relaxation and endothelial contraction were studied *ex vivo* in response to endothelin-1. Finally, the levels of hemoglobin A1c were calculated.

We found that oral administration of propagermanium didn't interfere with animal weight and didn't change Lee's index, however, it improved fasting glucose levels and insulin resistance, it didn't change total cholesterol and triglyceride levels, it didn't have a significant effect on the intraperitoneal glucose tolerance test, improved insulin sensitivity and endothelial dysfunction, and recovered the anti-contractile effect of perivascular adipose tissue.

The presence of propagermanium improved endothelial dysfunction and recovered the vasodilating phenotype of perivascular adipose tissue probably due to its anti-inflammatory features. So, perivascular adipose tissue is involved in the regulation of endothelial function and appears as a potential therapeutic target for vascular dysfunction related to type 2 diabetes.

Keywords: anti-inflammatory, type 2 diabetes, endothelial dysfunction, inflammation, perivascular adipose tissue

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes tipo 2

A diabetes *mellitus* é vista como um dos mais sérios desafios de saúde global do século XXI (Evans *et al.*, 2000) e a sua prevalência está a aumentar em todo o mundo. De acordo com a Federação Internacional da Diabetes, em 2015, morreram 5 milhões de adultos com diabetes e a estimativa do número de pessoas com diabetes, entre os 20 e 79 anos, no mundo era de 415 milhões, incluindo 193 milhões não diagnosticados. Há ainda 318 milhões de adultos com intolerância à glicose e, por isso, em risco de desenvolver a doença no futuro. Em 2040, prevê-se um aumento para 642 milhões de pessoas com diabetes no mundo, das quais 71,1 milhões na região europeia (International Diabetes Federation, 2015; Spijkerman *et al.*, 2003; Whiting *et al.*, 2011).

A diabetes tipo 2 é a forma mais prevalente, ocorre geralmente em adultos mas é cada vez mais frequente em crianças e adolescentes (International Diabetes Federation, 2015).

A diabetes tipo 2 é um distúrbio metabólico multifatorial que se caracteriza por uma deficiência absoluta ou relativa da insulina associada ao fator insulino-resistência, o que conduz a complicações vasculares. Na diabetes tipo 2 há uma resposta anormal à insulina, sendo elevados os níveis de insulina e glicose no sangue (Lee *et al.*, 2014).

Na fase inicial de resistência à insulina, verifica-se uma hiperplasia e hipertrofia compensatória das células β , isto é, estas aumentam a função secretora de modo a compensar e controlar a hiperglicemia. Segue-se uma secreção deficiente de insulina mediada pela perda progressiva da função das células β incluindo a secreção de insulina estimulada pela glicose, o que leva à apoptose induzida por glicotoxicidade e lipotoxicidade. A falência progressiva das células β é um componente central do desenvolvimento e da progressão da doença associada a uma crescente insulino-resistência (Lu *et al.*, 2017; Tangvarasittichai, 2015).

A diabetes tipo 2 surge frequentemente associada à obesidade e a um estilo de vida sedentário, ou seja, falta de exercício. Os pacientes apresentam um elevado risco de desenvolverem complicações vasculares, como por exemplo, nefropatia, retinopatia, neuropatia, doença vascular periférica, acidente vascular cerebral ou doenças cardiovasculares (Tangvarasittichai, 2015).

Há evidências que sugerem uma relação recíproca entre a resistência à insulina e a disfunção endotelial.

1.2. Função Endotelial

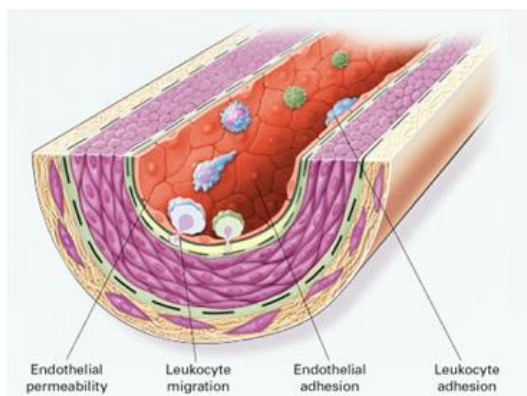


Figura 1: Esquema representativo da parede de uma artéria
(<https://www.slideshare.net/farhadjahanfar/lipoprotein-42779439>)

O endotélio é uma monocamada de células endoteliais que reveste o lúmen de todos os vasos sanguíneos e mantém a homeostase através de múltiplas funções fisiológicas. Estas células funcionam como uma barreira seletiva entre o sangue circulante e os tecidos da parede do vaso, e proporcionam ainda uma barreira protetora contra a trombose, a inflamação local e a proliferação de células musculares (figura 1) (Zaborska *et al.*, 2016).

A importância deste órgão endócrino e parácrino revela-se pela sua função de regulação do tónus vascular, da fluidez do sangue e da coagulação através da libertação de vários fatores vasoativos, incluindo fatores vasodilatadores (fator hiperpolarizante derivado do endotélio, prostaciclina (PGI_2), óxido nítrico (NO)) e fatores vasoconstritores (endotelina-1 (ET-1), tromboxano A2 (TXA2) e angiotensina II) (Edwards *et al.*, 2010; Félétou & Vanhoutte, 2006). Os fatores vasoativos produzidos pelo endotélio medeiam a vasodilatação ou a vasoconstrição e a produção desses fatores permanece em equilíbrio em condições fisiológicas normais (Hsueh & Quiñones, 2003).

As prostaglandinas, primeiras substâncias vasoativas identificadas produzidas pela vasculatura, são sintetizadas a partir de ácido araquidónico (AA), por duas enzimas ciclooxigenases (COX1 e COX2), que são expressas em adipócitos, células endoteliais e macrófagos. A PGI_2 , o TXA2, a prostaglandina E2 (PGE_2), a prostaglandina D2 (PGD_2) e a prostaglandina F2 α ($\text{PGF}2\alpha$) constituem as cinco prostaglandinas primárias e são capazes de modular a contratilidade vascular através da ativação de recetores de prostaglandinas específicos, induzindo a vasoconstrição ($\text{PGF}2\alpha$, TXA2) ou vasodilatação (PGD_2 , PGI_2) ou ambos (PGE_2) (figura 2) (Zaborska *et al.*, 2016).

A PGI_2 é a prostaglandina mais abundante produzida pelo endotélio e é um importante vasodilatador endógeno, que, através da ativação da adenilato ciclase promove a produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e o consequente relaxamento das células do músculo liso vascular. Este relaxamento mediado por prostaciclina está associado à abertura/ativação de canais de potássio (K^+) nas células do músculo liso vascular, incluindo canais de K^+ sensíveis a trifosfato de adenosina (ATP) (Zaborska *et al.*, 2016).

O TXA_2 atua de forma autócrina e parácrina, e liga-se ao recetor acoplado à proteína G das plaquetas (recetor TP). O TP é acoplado à proteína G_q , que ativa a via de sinalização da fosfolipase C, provocando a agregação plaquetária. O TXA_2 é também um sinal de amplificação para outros agonistas e, por conseguinte, a inibição da COX-1 controla indiretamente outras vias de ativação de plaquetas (Olechowski *et al.*, 2017).

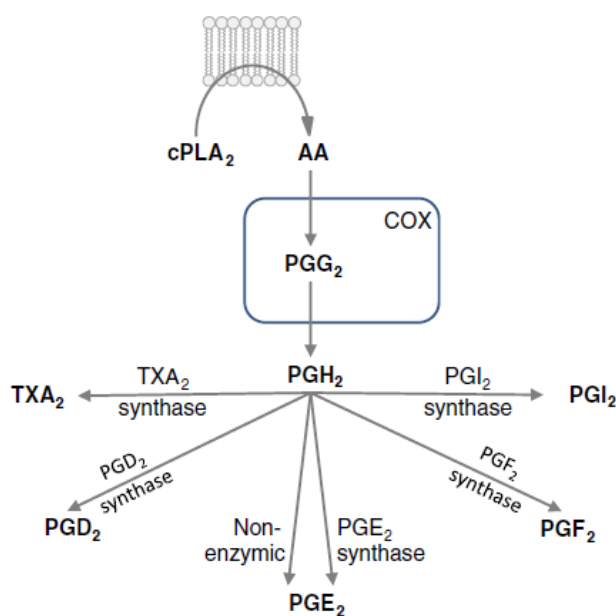


Figura 2: Prostanóides derivados da ciclooxigenase. (cPLA2 = fosfolipase A2, AA = ácido araquidónico, COX = ciclooxigenase, PGG_2 = prostaglandina G2, PGH_2 = prostaglandina H2, TXA_2 = tromboxano A2, PGD_2 = prostaglandina D2, PGE_2 = prostaglandina E2, PGF_2 = prostaglandina F2, PGI_2 = prostaglandina I2 (prostaciclina)) Adaptado (Floyd & Ferro, 2014)

1.2.1. Óxido Nítrico

A substância vasodilatadora mais importante produzida no endotélio é o NO (Hadi & Suwaidi, 2007). O NO é uma molécula de sinalização gasosa de curta duração envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos do sistema cardiovascular

(Dudzinski & Michel, 2009). Este influencia a função vascular por dois mecanismos diferentes: a ativação de uma guanilato ciclase solúvel (GCs), através da formação do monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e a sinalização dependente da S-nitrosilação de proteínas com tióis reativos. A via da GCs controla o relaxamento dependente do NO do músculo liso vascular, dado que os níveis crescentes de cGMP ativam canais de K^+ sensíveis ao cálcio e canais de K^+ sensíveis ao ATP, o que conduz a uma diminuição da concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular e consequente relaxação do músculo liso vascular (Zaborska *et al.*, 2016). O NO é um protetor vascular, inibe a inflamação e é responsável pela estimulação da vasodilatação, inibição da proliferação de células do músculo liso, adesão dos leucócitos e agregação das plaquetas (Hamilton & Watts, 2013).

1.2.1.1. Produção de Óxido Nítrico

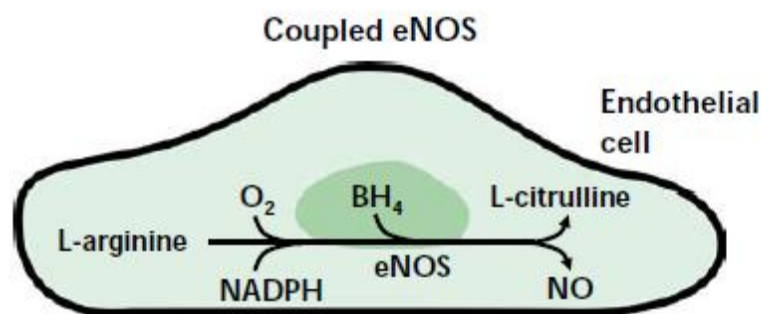


Figura 3: Produção de NO a partir de L-arginina e oxigênio (O_2) pela eNOS, juntamente com tetrahydrobiopterina (BH_4) e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (fosfato) (NADPH). Adaptado (Hamilton & Watts, 2013)

A produção de NO deve-se à conversão enzimática do aminoácido L-arginina em L-citrulina, mediada pelo complexo enzimático sintase de monóxido de azoto (NOS) (Mudau *et al.*, 2012; Potenza *et al.*, 2009; Simsek *et al.*, 2010).

Existem três isoformas diferentes da NOS: a NOS neuronal, a NOS indutível e a NOS endotelial (eNOS). Todas as isoformas da NOS podem ser encontradas em mais do que um tipo de tecido e, para além do endotélio, a eNOS também é expressa em plaquetas, no músculo cardíaco entre outros (Dudzinski & Michel, 2009).

A eNOS atua como um homodímero funcional e é estruturalmente dividida em dois domínios: um domínio redutase no terminal carboxílico e um domínio oxigenase no terminal amínico (Li *et al.*, 2006). No domínio oxigenase da eNOS, o oxigênio

molecular liga-se ao grupo heme reduzindo-o; depois, incorpora L-arginina, que é oxidada para formar NO e L-citrulina. Para que haja uma produção eficiente de NO, a eNOS deve coordenar a ligação de diversos substratos e cofatores, tais como tetrahydrobiopterina (BH₄), calmodulina e L-arginina, no terminal amínico; mononucleótido de flavina, dinucleótido de flavina e adenina e dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato (NADPH), no terminal carboxílico (figura 3) (Hamilton & Watts, 2013).

A atividade e a biodisponibilidade da eNOS são fundamentais para manter a função dos vasos sanguíneos. A atividade da eNOS é regulada por um grande número de modificações pós-traducionais, incluindo a acilação de ácidos gordos, a disponibilidade de substrato e cofatores, o grau de fosforilação, S-nitrosilação, acetilação, interações entre proteínas e é sensível a alterações na concentração de Ca²⁺ (Sena *et al.*, 2013).

A fosforilação regula a eNOS em dois locais principais com efeitos opostos: a fosforilação da serina 1177, que conduz à ativação da eNOS, e a fosforilação da treonina 495, que diminui a sua atividade (Dudzinski & Michel, 2009).

1.2.2. Disfunção endotelial e mecanismos associados

A função do endotélio vascular está comprometida na obesidade e na diabetes tipo 2, e um desequilíbrio na sua função pode levar ao desenvolvimento de doenças vasculares (Hamilton & Watts, 2013; Zaborska *et al.*, 2016). A alteração da sinalização de insulina no endotélio aumenta a ocorrência de lesões ateroscleróticas e disfunção vascular (Paneni, 2015).

A disfunção endotelial refere-se à incapacidade do endotélio manter a homeostase vascular, reflete um desequilíbrio nas substâncias vasoativas derivadas do endotélio e está associada a vasoconstrição e a um ambiente pro-oxidante e pro-inflamatório, aumentando assim a resistência periférica e conseqüentemente a pressão sanguínea (Hamilton & Watts, 2013; Zaborska *et al.*, 2016).

O principal marcador da disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade do NO, que envolve tanto a diminuição da sua síntese como o aumento da sua degradação e conseqüente perda de atividade biológica, associado ainda ao aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Qian & Fulton, 2013; Simsek *et al.*, 2010).

A disfunção endotelial é um indicador precoce de doença vascular e, além da biodisponibilidade insuficiente de NO, é caracterizada também pela redução da vasodilatação dependente do endotélio onde há modificação da atividade e desacoplamento da eNOS, desregulação hemodinâmica, aumento do *stress* oxidativo e formação de ROS, aumento da produção de fatores de crescimento, aumento da expressão de moléculas que são responsáveis pela adesão celular e de genes inflamatórios e aumento da permeabilidade do endotélio vascular (Qian & Fulton, 2013; Sena *et al.*, 2013).

A reduzida mobilização ou o esgotamento das células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea estão envolvidas na patogênese da disfunção endotelial. Na diabetes tipo 2 é possível ver a relação entre a diminuição dos níveis das células progenitoras e o aumento dos níveis das micropartículas derivadas de células endoteliais sob condições de ativação celular ou lesão/apoptose (Qian & Fulton, 2013).

Outro mecanismo envolvido na disfunção endotelial e associado à obesidade é o aumento da atividade da COX1 e COX2. O aumento da produção de TXA2 e redução da liberação de PGI₂ relaciona-se com o aumento da produção de prostaglandinas a partir do AA pela COX2, induzida por inflamação (Lobato *et al.*, 2011).

A inflamação relacionada com a resistência à insulina e a diabetes tipo 2 reflete-se no aumento dos níveis séricos do fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), ET-1 e proteína C reativa de alta sensibilidade, também verificado na disfunção endotelial (Natali *et al.*, 2006).

1.3. *Stress* Oxidativo

O *stress* oxidativo descreve uma produção excessiva de ROS que afetam os mecanismos de defesa antioxidantes endógenos (Sena *et al.*, 2013). As ROS podem ser geradas por fatores ambientais ou por fatores endógenos, como, por exemplo, durante o metabolismo energético na mitocôndria. Estas espécies vão atacar os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos e tornam a expressão e a secreção de insulina deficiente, aumentando ainda a apoptose (Yang *et al.*, 2011).

O *stress* oxidativo desempenha um papel importante na diabetes tipo 2. A hiperglicemia e a resistência à insulina induzem a formação de radicais livres que são responsáveis por diversos danos nos tecidos. A disfunção mitocondrial e a ativação da

NADPH oxidase vascular são as principais fontes de radicais livres. A relação entre a inflamação, o *stress* oxidativo e a atividade de produtos finais da glicação avançada (AGEs), promove uma resposta de imunidade inata. As ROS em quantidades excessivas afetam a regulação de proteínas de sinalização que são responsáveis pela homeostase (Sena *et al.*, 2013).

1.3.1. Espécies Reativas de Oxigênio

As ROS podem ser formadas através da via do poliol. A aldose-redutase (AR), enzima da via do poliol, reduz a glicose a sorbitol e tem baixa afinidade para o substrato, por isso, a glicose tem de se encontrar em concentrações elevadas para que a reação possa ocorrer. Na transformação da glicose, a AR consome NADPH, que é necessário para reduzir a glutatona (GSH). Na diabetes tipo 2 há uma deficiência na GSH, pois esta é sintetizada a partir de glutamato, cisteína e glicina e os pacientes diabéticos apresentam uma deficiência na cisteína e glicina. Os pacientes com diabetes tipo 2 têm concentrações mais baixas de GSH nos eritrócitos do que os indivíduos normais não diabéticos, e uma concentração mais elevada de glutatona oxidada (GSSG). Uma das principais fontes de NADPH é a glicose-6-fosfato desidrogenase, que converte a glicose em ribose-5-fosfato e cuja atividade diminui em condições de hiperglicemia, o que relaciona os baixos níveis de NADPH com a GSH. Outra fonte metabólica importante para o NADPH vem do dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato oxidado (NADP⁺) - dependente da isocitrato desidrogenase (IDH). Todavia, a IDH é muito suscetível de sofrer fragmentação e carbonilação quando é exposta aos açúcares redutores, tais como glicose, glicose 6-fosfato e frutose. Então, a glicação conduz à inativação de NADP⁺ dependente da IDH, durante a progressão da diabetes tipo 2 e havendo uma diminuição na produção do NADPH. Esta diminuição induz o aumento da formação de ROS e consequente fragmentação do ácido desoxirribonucleico, peroxidação de lípidos, e redução nos níveis de ATP ao nível da mitocôndria (Rosales-corrall *et al.*, 2015). Efetivamente, a hiperglicemia associada à diabetes conduz a um grande aumento de *stress* oxidativo, através de diversos processos bioquímicos que incluem a via do poliol, a via da hexosamina, a formação de AGEs e a ativação da proteína cinase C (Sena *et al.*, 2013).

1.3.2. Desacoplamento da eNOS

Com o aumento do *stress* oxidativo, a BH₄, um cofator que regula fortemente a produção do NO, é oxidada a 7,8-di-hidrobiopterina, o que resulta no desacoplamento da eNOS e na conseqüente redução da produção de NO, mas a BH₄ pode ser regenerada através de di-hidrofolato redutase. A ausência deste cofator leva a um ciclo de *stress* oxidativo vascular através da transferência de elétrons ao oxigênio molecular, formação de espécies oxidantes, tais como o superóxido e peroxinitrito (Qian & Fulton, 2013), e é provável que seja uma das principais causas não só do desacoplamento da eNOS, mas também da disfunção endotelial (figura 4) (Xia *et al.*, 2016).

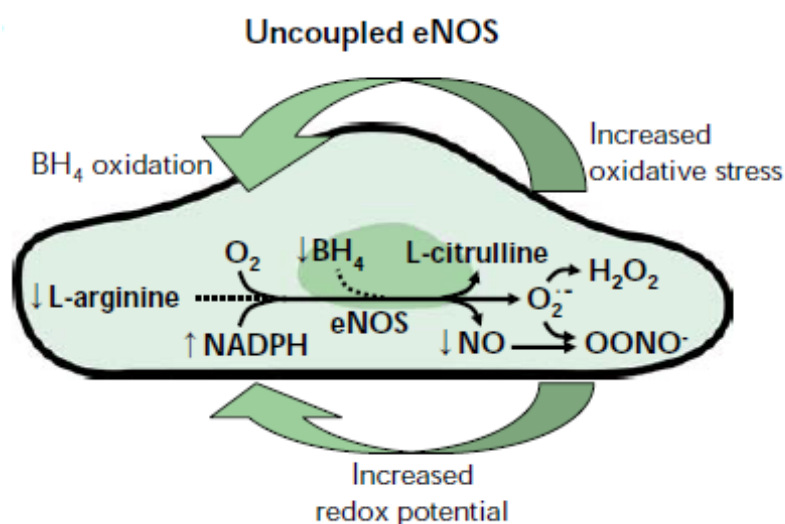


Figura 4: O desequilíbrio redox (devido ao aumento do NADH/NADPH) diminui a disponibilidade de BH₄ (devido à oxidação) o que leva ao desacoplamento da eNOS e à diminuição da produção de NO. A transferência de elétrons para o O₂ forma o superóxido, agravando a disfunção endotelial e o *stress* oxidativo. Adaptado (Hamilton & Watts, 2013)

Se o substrato da eNOS não se encontrar na concentração adequada ou se o cofator estiver ausente, pode haver produção de anião superóxido e peroxinitrito, pois não há uma dimerização completa da eNOS o que resulta no seu desacoplamento levando ao aumento do *stress* oxidativo (Sena *et al.*, 2013). O superóxido formado pode causar vasoconstrição, devido à produção de peroxinitrito, que, por sua vez, aumenta a produção de prostaglandinas vasoconstritoras e também pode causar vasoconstrição através da redução da biodisponibilidade de NO (Zaborska *et al.*, 2016).

O desacoplamento da eNOS potencia deste modo o *stress* oxidativo, porque a eNOS desacoplada leva à superprodução de ROS (superóxido e, posteriormente, peroxinitrito, por exemplo) e consequente aumento da oxidação de BH₄, o que se traduz numa regulação positiva da expressão e atividade da arginase, originando-se um ciclo vicioso (Xia *et al.*, 2016).

Outra causa para o desacoplamento da eNOS é a deficiência de L-arginina, devido à sobre-regulação da expressão e atividade da arginase, referida anteriormente. Existem duas isoformas da arginase que têm funções semelhantes, isto é, metabolizam a L-arginina em ureia e L-ornitina, onde um aumento da expressão de arginase nas células endoteliais diminui a biodisponibilidade de L-arginina para a produção de NO, o que leva à disfunção endotelial. A expressão da arginase aumenta devido a uma grande variedade de estímulos, como a angiotensina II, o elevado teor de glicose, a trombina, a lipoproteína de baixa densidade oxidada, o que conduz a inflamação vascular (Pernow & Jung, 2013; Yang & Ming, 2013).

1.4. Resistência à insulina

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

A resistência à insulina é definida por uma resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena, que se reflete numa diminuição da capacidade da insulina para promover a captação de glicose no músculo-esquelético e tecido adiposo e para suprimir a produção de glicose hepática (Leahy, 2005; Reaven, 1988). Um estilo de vida moderno com inatividade física, obesidade abdominal e excesso de adipocinas podem causar resistência à insulina (Tangvarasittichai, 2015).

A resistência à insulina aumenta e/ou diminui as respostas de compensação da secreção de insulina, causa hiperinsulinemia, provoca um aumento dos níveis de glicose através do aumento da gliconeogénese hepática e da produção de glicose, reduz a lipólise no tecido adiposo, o que leva a um elevado fluxo de ácidos gordos livres (FFA), aumenta a secreção hepática de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), o que

causa hipertrigliceridemia e reduz os níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade (HDL) (Avramoglu *et al.*, 2006; Tangvarasittichai, 2015).

O aumento dos níveis de glicose, FFA e insulina levam a uma sobreprodução de ROS, aumento do *stress* oxidativo e ativam vias de fatores de transdução de *stress*, o que pode causar inibição da atividade e secreção da insulina (figura 5) (Tangvarasittichai, 2015). De salientar que a insulina tem uma função vasodilatadora, uma vez que estimula a produção de NO pelo endotélio, provocando o relaxamento dos vasos (Quon, 2006).

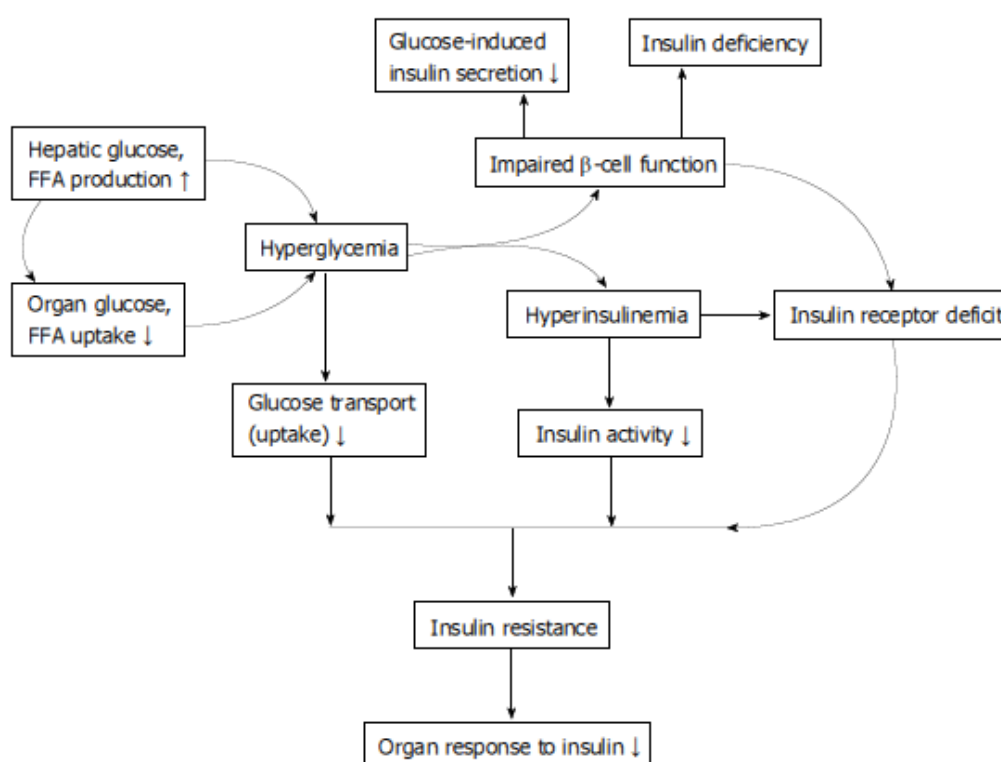


Figura 5: Evolução da resistência à insulina e consequência da disfunção das células β . Adaptado (Tangvarasittichai, 2015)

A resposta celular à insulina envolve duas cascatas-chave de sinalização: os efeitos metabólicos e hemodinâmicos são mediados pela fosfatidilinositol-3 cinase (PI-3K) e a via das proteínas-cinases ativadoras da mitogénese (MAPK) está envolvida principalmente na regulação da expressão génica, crescimento celular e diferenciação. Normalmente, a insulina estimula a produção de NO nas células endoteliais através da ativação da NO sintase através da via PI-3K. Na resistência à insulina, verifica-se uma

regulação negativa da via PI-3K e a produção de NO é diminuída, verificando-se ativação da cascata MAPK, levando à disfunção endotelial. A insulina estimula a produção do vasoconstritor ET-1 e aumenta a expressão da molécula de aderência celular, PAI-1 (figura 6). Além dos efeitos diretos da resistência à insulina sobre o endotélio, também há a estimulação da proliferação e a migração das células vasculares do músculo liso (VSMC) e no tecido adiposo está associada à libertação excessiva de FFA, que evoca a expressão génica patogénica através da ativação da proteína cinase C e aumento do *stress* oxidativo (Sena *et al.*, 2013).

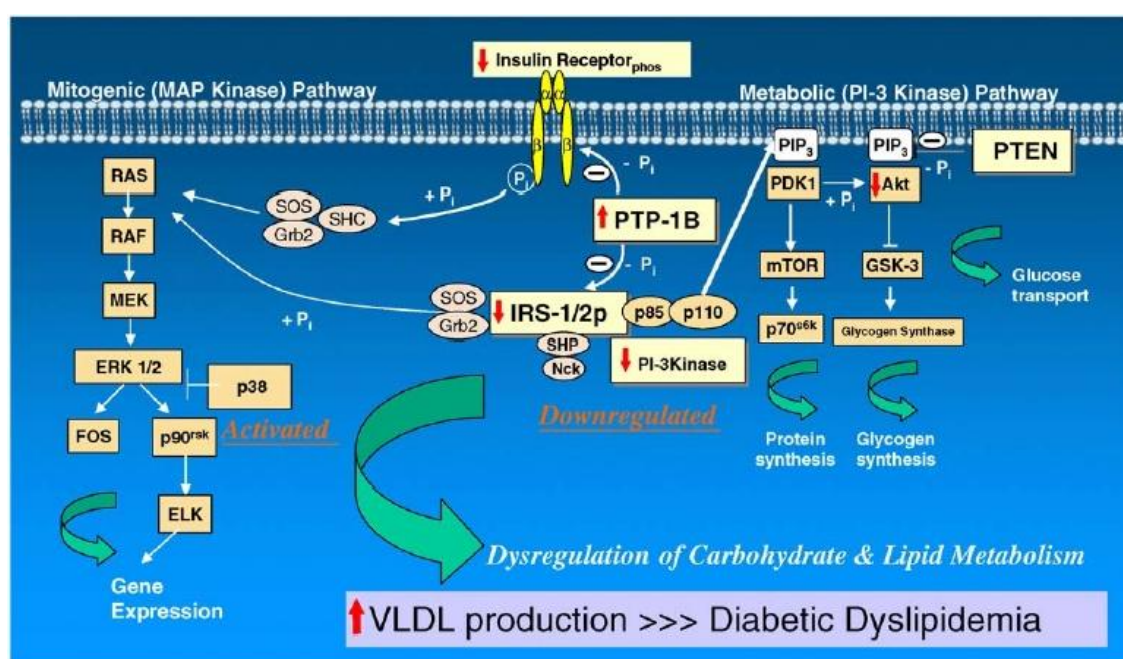


Figura 6: Cascata de sinalização de insulina e desregulação em estados de resistência à insulina. A perturbação na proteína fosfo-tirosina fosfatase (PTP-1B) parece ser um importante fator iniciador na indução de resistência à insulina e na regulação negativa da via PI-3K. Os defeitos na transdução do sinal da insulina conduzem à desregulação do metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos. Adaptado (Avramoglu *et al.*, 2006)

O aumento da libertação de FFA pelo tecido adiposo, que se verifica num estado de resistência à insulina, e a diminuição da absorção de FFA pelo tecido adiposo muscular podem resultar num aumento do influxo de FFA no fígado. Este “ciclo vicioso” pode resultar numa atenuação da sinalização de insulina nesses tecidos e influenciar negativamente a resistência à insulina (Dresner *et al.*, 1999).

A insulina estimula as enzimas envolvidas na lipogénese de novo e, em condições onde o influxo de gordura para o fígado excede o efluxo, há excesso de absorção,

síntese e secreção de ácidos gordos hepáticos e a esteatose hepática pode ocorrer em simultâneo com a resistência à insulina (Avramoglu *et al.*, 2006).

O excesso de FFA induzido por resistência à insulina é essencial também no desenvolvimento de dislipidemia, principalmente caracterizada por alterações do perfil normal lipídico e das lipoproteínas no plasma, o que promove ainda mais o desenvolvimento de um perfil lipídico pro-aterogénico (Avramoglu *et al.*, 2006; Sena *et al.*, 2013).

A dislipidemia que é provocada pela elevada quantidade plasmática da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e/ou VLDL leva à diminuição da HDL, o que indica que pode ser um fator responsável pelo desenvolvimento da resistência à insulina e diabetes tipo 2. No entanto, a dislipidemia também pode ocorrer como resultado de resistência à insulina, verificando-se um aumento da produção de lípidos plasmáticos, isto é, um aumento dos níveis de triglicédeos (TG), colesterol total e FFA, devido à grande estimulação das vias de recetores de insulina causada pela hiperinsulinemia - elevada concentração de insulina na corrente sanguínea. Essas alterações lipídicas estão associadas ao aumento da apolipoproteína B, que é um componente estrutural essencial das lipoproteínas aterogénicas (Avramoglu *et al.*, 2006; Funke *et al.*, 2014). Uma vez que a dislipidemia tem um desenvolvimento muito rápido, é possível investigar os seus efeitos na resistência à insulina antes de ocorrerem as alterações no peso corporal (Funke *et al.*, 2014).

A inflamação crónica é também considerada como um dos mecanismos mais importantes que explicam a etiologia da resistência à insulina, diabetes tipo 2 e a síndrome metabólica. No entanto, a inflamação hepática induzida por colesterol não provoca o aumento do desenvolvimento da resistência à insulina. A redução da inflamação hepática não corresponde ao aumento da sensibilidade à insulina, o que indica que há outros fatores envolvidos na resistência à insulina (Funke *et al.*, 2014).

1.5. Dieta rica em gorduras

Apesar de a diabetes tipo 2 ser determinada, principalmente, pelo estilo de vida e pela genética, a composição dietética pode afetar o seu desenvolvimento e desempenhar um papel significativo na melhoria da sensibilidade à insulina e na redução do risco e complicações associadas. O papel da gordura dietética na diabetes tipo 2 tem sido alvo

de estudo ao longo de décadas e o seu particular interesse deve-se ao facto de os ácidos gordos (FA) influenciarem o metabolismo da glicose, alterando a composição e a função da membrana celular, a atividade enzimática, a sinalização de insulina e a expressão génica. A composição de FA das membranas celulares afeta várias funções celulares, incluindo a fluidez da membrana, a permeabilidade iónica e a ligação/afinidade do recetor de insulina (Risérus *et al.*, 2009).

Os FFA, que são obtidos através de fontes alimentares ou produzidos através da lipogénese de novo, podem ser armazenados ao nível intracelular pelo tecido adiposo sob a forma de TG, exportados para o plasma sob a forma de VLDL ou podem ser utilizados no fornecimento de energia pela via de oxidação de FFA (Avramoglu *et al.*, 2006).

Os FFA no plasma são um fator de risco relevante no desenvolvimento da resistência à insulina, na disfunção das células β e na diabetes tipo 2. O aumento da quantidade de FFA pode inibir a captação de glicose e oxidação no músculo e prejudicar a supressão da produção de glicose hepática pela insulina (Boden & Chen, 1995). Além disso, os FFA são lipotóxicos para as células β que, quando são expostas a uma ação prolongada dos FFA, exibem uma secreção de insulina deficiente (Unger, 1995). De facto, as células β são particularmente sensíveis ao grau de insaturação dos ácidos gordos (Lopez *et al.*, 2008).

Os FFA saturados, monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) podem ter diferentes efeitos na sensibilidade à insulina, na secreção de insulina e noutras vias metabólicas (Bhaswant *et al.*, 2015; Lopez *et al.*, 2008). Há uma forte evidência de que os ácidos gordos saturados (SFA) dessensibilizam seletivamente a resposta do tecido periférico à insulina, enquanto os ácidos gordos insaturados (incluindo MUFA e PUFA) provocam um efeito contrário, isto é, preservam ou melhoram a secreção e a sensibilidade à insulina, através de modificações na composição das membranas celulares, sendo suscetíveis de reduzir o risco de diabetes tipo 2 (Abdul-Ghani *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2008).

Os SFA também afetam a atividade enzimática, a expressão genética inflamatória e os fatores de transcrição, o que contribui para os seus efeitos no metabolismo da glicose (Risérus *et al.*, 2009). Na presença de resistência à insulina, a substituição de gordura saturada por gordura insaturada diminui não só o colesterol LDL, mas também os triglicerídeos VLDL (Riccardi *et al.*, 2004).

Há estudos *in vitro* e experiências com animais que sugerem que os SFA podem atuar diretamente nos tecidos sensíveis à insulina (Risérus *et al.*, 2009). Quando os ratos são sujeitos a uma alimentação com um elevado teor de gordura, ou seja, uma dieta rica em gorduras (HFD), verifica-se um aumento do colesterol no organismo e dos níveis plasmáticos de lípidos - hiperlipidemia. Apesar de a HFD a curto prazo não resultar no ganho de peso corporal ou aumento de tecido adiposo, a dislipidemia é agravada e a taxa de produção de glicose é maior. No entanto, uma HFD de longa duração pode induzir mecanismos compensatórios, levando à adaptação e normalização relativa da função endotelial (Xia *et al.*, 2016; Funke *et al.*, 2014).

A hiperglicemia e hiperlipidemia são fatores de risco independentes que em conjunto ou individualmente aceleram a aterosclerose e aumentam o risco das complicações diabéticas (Liu *et al.*, 2015). A obesidade está relacionada com a resistência à insulina, diabetes tipo 2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Xia *et al.*, 2016). Outro fator que aumenta o risco de doenças cardiovasculares é a hipercolesterolemia induzida por colesterol dietético (Berger *et al.*, 2015; McNamara, 2000).

Estudos de alimentação animal demonstraram que, para a maioria das espécies, são necessárias grandes doses de colesterol para induzir hipercolesterolemia e aterosclerose, enquanto que, para outras espécies, mesmo pequenas ingestões de colesterol induzem hipercolesterolemia. A resposta do colesterol plasmático ao colesterol dietético é altamente variável entre e dentro das espécies animais, uma vez que os seres humanos têm o colesterol LDL como a lipoproteína predominante do plasma, mas a maioria dos modelos animais possuem uma maior fração de colesterol HDL, o que torna difícil a indução de hipercolesterolemia e aterosclerose em roedores (McNamara, 2000).

O consenso geral é de que o colesterol dietético tem um efeito significativo sobre os níveis plasmáticos de colesterol, podendo ocorrer tanto alterações na fração de colesterol LDL aterogénico como na fração de colesterol HDL anti-aterogénico. O colesterol dietético aumenta os níveis de colesterol total, colesterol LDL e HDL, mas há dados que indicam que a razão plasmática LDL:HDL permanece constante (Clarke *et al.*, 1997; Ginsberg *et al.*, 1994).

Contudo, além da diminuição da ingestão de gordura saturada e do aumento da gordura insaturada, é importante lembrar que outros componentes da dieta, como a fibra

dietética e os carboidratos, também podem influenciar a sensibilidade à insulina e, portanto, o risco de diabetes tipo 2 (Rivellese & Lilli, 2003).

1.6. Tecido Adiposo Perivascular

O tecido adiposo perivascular (PVAT) é um órgão endócrino que liberta uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas que têm influência na vasculatura. A maior parte dos vasos sanguíneos estão rodeados por PVAT, sendo a artéria mesentérica, a artéria coronária, a artéria carótida, a artéria femoral, e a aorta os principais vasos sanguíneos estudados (Villacorta & Chang, 2015). No entanto, este encontra-se ausente na vasculatura cerebral e na microvasculatura (Miao & Li, 2012).

Os vasos sanguíneos são compostos por três camadas: túnica adventícia, túnica média e túnica íntima. A adventícia contém maioritariamente tecido conjuntivo, a túnica média (especialmente nas artérias) é principalmente constituída por músculo liso vascular e a túnica íntima é composta por células endoteliais. A contratilidade vascular é principalmente regulada pelo nível de atividade do músculo liso vascular que pode ser influenciada pelo endotélio (Zaborska *et al.*, 2016).

O PVAT consiste numa mistura heterogénea de estruturas celulares tais como (pré) adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e de músculo liso, células mesenquimais e imunológicas (macrófagos, linfócitos T) e ainda estruturas teciduais (pequenos vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e nervos) (figura 7) (Even *et al.*, 2014).

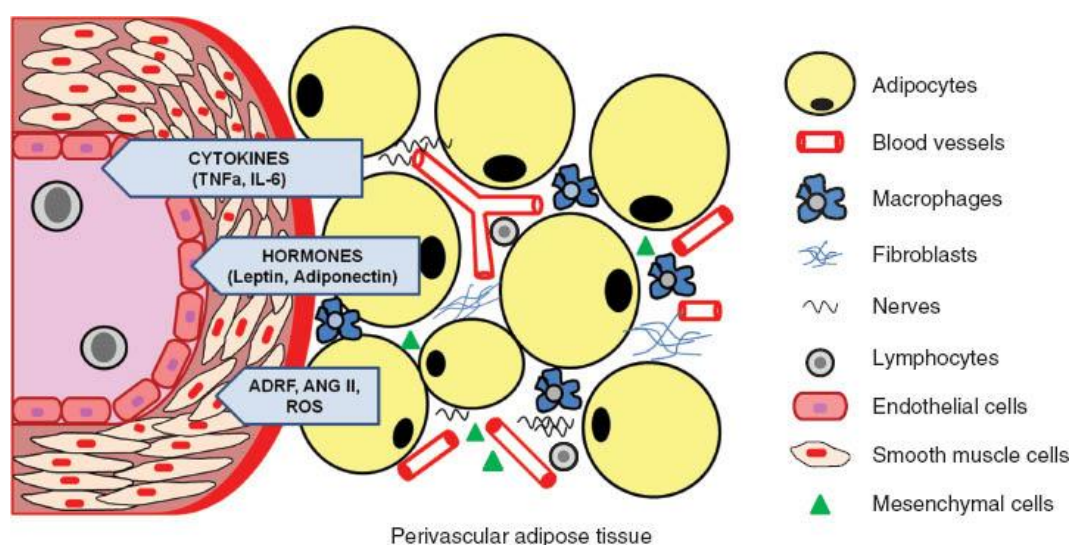


Figura 7: Crosstalk entre o PVAT e a vasculatura. Adaptado (Even *et al.*, 2014)

A composição do PVAT depende da localização anatômica. O PVAT é composto de tecido adiposo branco e castanho, constitui uma reserva energética e está associado à regulação térmica, respetivamente. Em torno da aorta abdominal e dos vasos mesentéricos, o PVAT é composto principalmente de tecido adiposo branco, enquanto o PVAT associado à aorta torácica é predominantemente tecido adiposo castanho (Miao & Li, 2012).

A descoberta da natureza anti-contrátil do PVAT sugere que a gordura que rodeia os vasos sanguíneos também pode modular o tónus vascular, em vez de fornecer apenas um suporte estrutural (Miao & Li, 2012). O PVAT tem a capacidade de produzir prostaglandinas e atenua a vasoconstrição arterial através da atenuação da resposta vascular de vários agonistas, como a fenilefrina, a angiotensina II, a serotonina e a ET-1 (Aghamohammadzadeh *et al.*, 2016; Zaborska *et al.*, 2016).

Foram identificados vários fatores vasoativos no PVAT tais como: adipocinas (pro-inflamatórias: leptina, resistina e visfatina; anti-inflamatórias: adiponectina e adrenomedulina), citocinas e quimiocinas (interleucina-1, IL-6, interleucina-8 (IL-8), TNF- α , proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e PAI-1), substâncias do sistema renina-angiotensina (angiotensina II e angiotensina 1-7), moléculas gasosas (NO, peróxido de hidrogénio, anião superóxido, sulfureto de hidrogénio), palmitato de metilo, prostaciclina, entre outros (Feng *et al.*, 2009; Gálvez-Prieto *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2007; Gil-Ortega *et al.*, 2014; Rajsheker *et al.*, 2010). Através da libertação destas substâncias, o PVAT pode regular o tónus vascular, o que é considerado uma função endócrina (Xia *et al.*, 2016).

O PVAT pode expressar complexos, tais como: recetores de adipocinas, proteína desacopladora 1, recetor ativado por proliferador de peroxissoma gama, recetor β_3 adrenérgico, recetor de citocinas, recetor de angiotensina II, enzima NADPH oxidase, eNOS (Dashwood *et al.*, 2007) e todas as isoformas da superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Ex-SOD), lipoxigenases e metaloproteases (Szasz & Webb, 2014).

Os efeitos vasculares do PVAT são complexos, envolvem alterações do tónus vasomotor, migração e proliferação de músculo liso, inflamação vascular, e *stress* oxidativo (Padilla *et al.*, 2015).

1.6.1. Produção de adipocinas

O PVAT produz substâncias derivadas dos adipócitos - adipocinas - como já referida a adiponectina, uma hormona vasodilatadora; NO; citocinas; ROS, MCP-1 e TNF- α que participam na regulação das funções metabólicas e endoteliais, através de mecanismos endócrinos e/ou parácrinos (Chen *et al.*, 2016; Even *et al.*, 2014).

As adipocinas e/ou citocinas são libertadas pelos adipócitos na circulação e são responsáveis pelo *crosstalk* entre o tecido adiposo e os órgãos-alvo de longa distância (por exemplo, fígado, músculo esquelético, rim, coração, e vasculatura) (Villacorta & Chang, 2015).

As adipocinas e outras moléculas produzidas pelo PVAT podem ter ações vasócrinas diretas, quer no músculo liso, quer no endotélio vascular (via *vasa vasorum*). Em condições normais, o PVAT exerce funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias, porém, na obesidade, devido à inflamação do PVAT, caracterizada pelo desequilíbrio entre as células pró e anti-inflamatórias, verifica-se a indução da secreção anormal de adipocinas e produção de ROS (Lastra & Manrique, 2015).

1.6.1.1. Adiponectina

A adiponectina é maioritariamente produzida por adipócitos e tem muitas funções biológicas que incluem a regulação do metabolismo dos ácidos gordos e da glicose, verificando-se, ainda, ao nível celular, um potencial anti-inflamatório, efeitos antidiabéticos, anti-aterogénicos e cardioprotetores, melhorando também a resistência à insulina e exibindo propriedades de sensibilização à insulina (Padilla *et al.*, 2015; Sena *et al.*, 2017). A libertação de adiponectina pelo PVAT modera o efeito vasorelaxante das artérias pequenas através do aumento da biodisponibilidade de NO (Aghamohammadzadeh *et al.*, 2016).

Os efeitos benéficos da adiponectina na vasculatura foram descritos tanto em estudos clínicos como em modelos animais. Contudo, apesar dos efeitos benéficos descritos na homeostase vascular, tem-se associado a hiperadiponectemia ao aumento da mortalidade cardiovascular (Sena *et al.*, 2017). Por outro lado, a redução da produção de adiponectina está associada à resistência à insulina e os seus níveis de circulação são significativamente reduzidos na obesidade e na diabetes tipo 2 (Padilla *et al.*, 2015; Sena *et al.*, 2017).

Conseqüentemente, a diminuição da secreção de adiponectina pelo PVAT pode fornecer um ambiente promissor para a inflamação e disfunção vascular. Os reduzidos níveis de adiponectina são acompanhados pelo aumento da NADPH oxidase vascular conduzindo a *stress* oxidativo. Os produtos de oxidação libertados a partir da parede da artéria, levam ao aumento da secreção de adiponectina pelo PVAT, representando um mecanismo de autocontrole concebido para atenuar o *stress* oxidativo vascular na diabetes tipo 2, o que indica que o *crosstalk* entre o PVAT e a vasculatura associada é bidirecional (ou seja, de fora para dentro e de dentro para fora). A redução da secreção de adiponectina a partir do tecido adiposo desempenha um papel importante no desenvolvimento de complicações vasculares associadas à diabetes tipo 2 (Padilla *et al.*, 2015).

1.6.2. Mecanismos associados ao tecido adiposo perivascular

O PVAT protege a função dos vasos atenuando a vasoconstrição através de diferentes mecanismos, incluindo a produção de fatores relaxantes derivados de adipócitos e a estimulação da geração de NO pelo endotélio (Chen *et al.*, 2016). No entanto, o PVAT pode contrair significativamente o músculo liso vascular através da libertação de vários fatores vasoconstritores, como a adrenalina e a prostaglandina, que contribuem para a contração dos vasos (Xia *et al.*, 2016).

O PVAT modula assim a vasoatividade nos modos contrátil e anti-contrátil. No entanto, os fatores derivados de PVAT, tais como adipocitocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, podem ter como alvo direto as células de músculo liso e as células endoteliais (Even *et al.*, 2014).

Os efeitos anti-contráteis do PVAT são mediados através da ativação de canais de K^+ , que são dependentes de Ca^{2+} . Os canais de K^+ são reguladores chave do potencial de membrana e, quando ativados, levam ao efluxo de K^+ e fecho de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, o que resulta em vasodilatação. Contudo, a inibição do canal K^+ resulta em despolarização e abertura dos canais de Ca^{2+} , com conseqüente contração (Zaborska *et al.*, 2016).

A proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) é um regulador importante da homeostase metabólica, tem uma ação anti-inflamatória no vaso e no tecido adiposo (Chen *et al.*, 2016) e tem um papel fundamental no metabolismo de glicose, lípidos e proteínas (Zaborska *et al.*, 2016).

A quantidade de PVAT varia em diferentes condições fisiopatológicas. Assim, a sua redução associada à hipertensão ou à lipoatrofia correlaciona-se com uma redução da produção de vasodilatadores e também com um aumento das respostas contráteis e pressão arterial. Ao contrário, um moderado espessamento do PVAT está associado ao aumento de vasodilatadores. O PVAT induz um efeito anti-contrátil, que se correlaciona positivamente com a quantidade de tecido adiposo circundante da artéria (Gil-Ortega *et al.*, 2014).

1.6.3. Tecido adiposo perivascular e as doenças cardiovasculares

O *crosstalk* entre o tecido adiposo e os vasos sanguíneos é vital para a homeostase vascular e é perturbado em doenças cardiovasculares e metabólicas, como a hipertensão, a diabetes e a obesidade. O PVAT está relacionado com as doenças cardiovasculares, como a aterosclerose e a hipertensão arterial (Even *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2016). O desenvolvimento de lesões ateroscleróticas nas artérias, principalmente envolvidas por PVAT, mostra que este desempenha o papel principal no desenvolvimento da lesão (Padilla *et al.*, 2015).

Fatores como a obesidade, o envelhecimento, a lesão vascular ou a infecção podem afetar o PVAT, o que causa uma anomalia adipocitária e infiltração de células inflamatórias, que são responsáveis pelo desequilíbrio de fatores de crescimento e inibidores segregados pelo PVAT, levando ao crescimento e migração de VSMC, o que resulta no desenvolvimento de doença vascular proliferativa (figura 8) (Miao & Li, 2012).

A obesidade é um fator de risco importante no desenvolvimento de diabetes tipo 2 e de doenças cardiovasculares e tem efeitos adversos sobre a estrutura e função cardiovascular. Nestas condições, a disfunção do PVAT é uma fonte de inflamação que afeta o sistema cardiovascular e contribui para as doenças cardiovasculares (Lastra & Manrique, 2015). A inflamação do PVAT promove a resistência à insulina, o que resulta em respostas vasodilatadoras anómalas, reduzindo o vasorelaxamento mediado pelo endotélio (Even *et al.*, 2014; Lastra & Manrique, 2015).

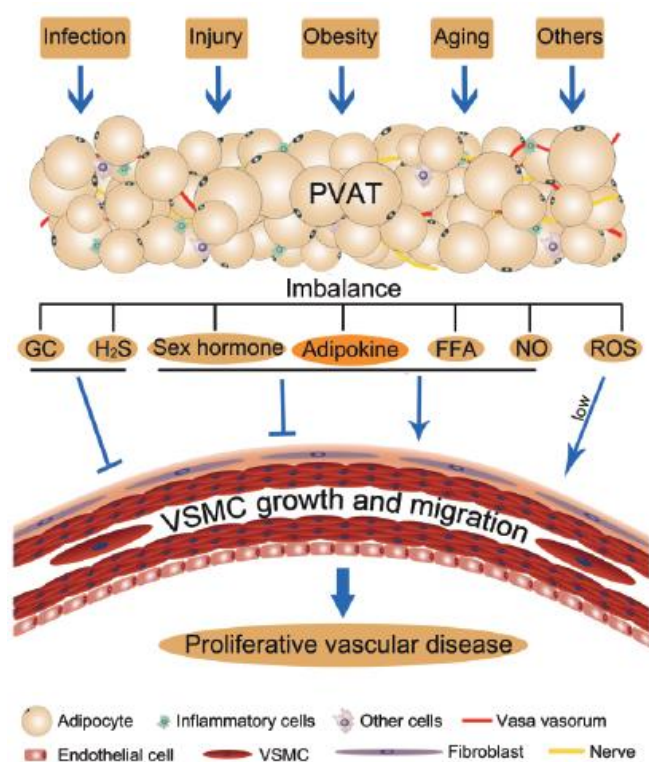


Figura 8: Diagrama esquemático da disfunção do tecido adiposo perivascular. Adaptado (Miao & Li, 2012)

Na obesidade e na diabetes tipo 2, a hipertrofia dos adipócitos leva à infiltração de células imunitárias, células pró-inflamatórias, que resulta na inflamação do tecido adiposo, *stress* oxidativo, hipóxia, maior expressão de marcadores inflamatórios, produção anormal de adipocinas, como o aumento na concentração de leptina, que pode acelerar o processo de aterosclerose e reduzir a expressão de fatores anti-inflamatórios, como a adiponectina, no PVAT, levando à perda do seu efeito dilatador (Achike *et al.*, 2011; Gil-Ortega *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2015). A obesidade também está associada ao aumento da atividade de COX1 e COX2 no tecido adiposo, o que leva à liberação de um fator pró-contrátil (TXA2) pelo PVAT (Meyer *et al.*, 2013).

Quando o PVAT está presente nas aortas de ratos obesos, este é responsável pela redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina, o que traduz a importância do PVAT na regulação da função vascular (Xia *et al.*, 2016).

Na obesidade, a acumulação de lípidos no PVAT estimula a defesa por imunidade inata, promovendo o recrutamento de monócitos no tecido adiposo e consequente desregulação da produção de adipocitocinas, o que leva à disfunção endotelial (Chen *et*

al., 2016). A disfunção do PVAT também está associada a uma regulação positiva de fatores vasoconstritores (Almabrouk *et al.*, 2014).

A obesidade induzida por HFD reduz significativamente a produção de NO pelo PVAT e aumenta a produção de superóxido e de ROS. As ROS existentes diminuem com a presença do N^oNitro-L-Arginina (L-NAME), um inibidor da eNOS, o que indica que a eNOS contribui para a produção de superóxido (Xia *et al.*, 2016).

O desequilíbrio entre os mecanismos pró-oxidante (isoforma da NADPH oxidase, superóxido, peróxido de hidrogênio) e antioxidante (eNOS, NO, SOD extracelular, GSSG) no PVAT, após um longo período de dieta gorda, contribuem para o agravamento da disfunção endotelial (Gil-Ortega *et al.*, 2014).

Os macrófagos presentes no PVAT contribuem para um ambiente inflamatório através da secreção de superóxido. A presença e a ativação de macrófagos no tecido adiposo são fundamentais para o aumento da contratilidade em artérias com gordura perivascular após a indução da inflamação (Aghamohammadzadeh *et al.*, 2016).

A atividade da AMPK é reduzida numa situação de obesidade e distúrbios metabólicos, contribuindo para a disfunção endotelial. A disfunção endotelial pode ser avaliada pela ativação da AMPK, que é responsável pelo aumento da fosforilação e ativação da eNOS. A AMPK atua no recetor de ativação da adiponectina, na hiperpolarização dependente de miócitos no PVAT, logo, a redução de AMPK também pode modificar o efeito do PVAT sobre a contratilidade vascular (Zaborska *et al.*, 2016).

O *stress* oxidativo e a inflamação local modulam a função endotelial e levam à redução dos efeitos anti-contráteis no PVAT, em indivíduos obesos. A catalase e a SOD podem resgatar os efeitos anti-contráteis do PVAT. Além disso, os efeitos anti-contráteis melhoram significativamente após uma cirurgia bariátrica, que é acompanhada pela redução da infiltração de macrófagos e pelo aumento da secreção de adiponectina no PVAT (Villacorta & Chang, 2015).

Deste modo, o PVAT emerge como um novo tipo de tecido adiposo que participa na patogênese de doenças cardiovasculares, de forma independente, e surge como um potencial alvo terapêutico para a obesidade e disfunção vascular relacionada com a diabetes (Even *et al.*, 2014).

1.7. Propagermanio

A obesidade e a resistência à insulina estão fortemente associadas a marcadores sistêmicos de inflamação e, clinicamente, a inflamação foi reconhecida como precedente da doença aterosclerótica (Tamura *et al.*, 2008). A expansão do tecido adiposo branco na obesidade pode constituir uma importante fonte de inflamação durante o desenvolvimento de doença vascular e muitos estudos demonstraram que a expressão de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo é, em parte, devida ao aumento da infiltração de macrófagos. Então, os tratamentos anti-inflamatórios podem ter um potencial terapêutico para reduzir o desenvolvimento de aterosclerose e outras doenças que têm por base a inflamação e a interrupção do recrutamento de macrófagos no tecido adiposo pode reduzir a resistência à insulina e ser uma nova intervenção terapêutica promissora no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 (Mulder *et al.*, 2017; Prospero *et al.*, 2014; Tamura *et al.*, 2008).

Suganami *et al.* criaram recentemente um sistema de co-cultura *in vitro* composto por adipócitos e macrófagos e demonstraram que um circuito parácrino envolvendo FFA e TNF- α , derivados de adipócitos e de macrófagos, respectivamente, estabelece um ciclo vicioso que aumenta as alterações inflamatórias em ambos. Verifica-se uma regulação positiva da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como MCP-1 e TNF- α , e uma regulação negativa da citocina anti-inflamatória adiponectina (Tamura *et al.*, 2008).

Há estudos que sugerem que os compostos que inibem a função do MCP-1 ou do receptor de quimiocinas C-C 2 (CCR2) podem ser um novo tipo de tratamento anti-inflamatório (Yokochi *et al.*, 2001). Tratamentos com inibidores de CCR2 produziram efeitos benéficos, incluindo a diminuição da infiltração de macrófagos no tecido adiposo (incluindo o perivascular), redução dos níveis de citocinas inflamatórias e melhoria da sensibilidade à insulina em modelos animais de ratinho (Prospero *et al.*, 2014).

O propagermanio (Bis(2-carboxyethylgermanium(IV) sesquioxide)), um polímero hidrófilo de propionato de 3-oxigrenil, composto de germânio orgânico, possui uma potente atividade moduladora imune associada a propriedades anti-inflamatórias e antineoplásicas, aumenta as funções dos linfócitos em células CD4 e CD8 e em células *natural killers* (NK), induz a produção de várias citocinas. É um fármaco clinicamente relatado como anti-inflamatório, antiviral e com propriedades antineoplásicas, é

utilizado no tratamento da hepatite no Japão e sabe-se que este anti-inflamatório inibe o CCR2 e suprime a infiltração de macrófagos/monócitos *in vitro* e *in vivo*, reduzindo a aterosclerose em modelos animais knockout para apolipoproteína E (Hirayama *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 2002; Yokochi *et al.*, 2001).

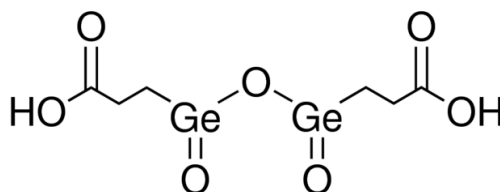


Figura 9: Estrutura molecular do propagermanio

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/396265?lang=pt®ion=PT>)

O germânio está presente em muitas ervas orientais como composto orgânico e pode ter uma atividade imunoestimuladora. Cada composto de germânio tem atividades farmacológicas únicas correspondentes à sua especificidade estrutural (Hirayama *et al.*, 2003).

Do ponto de vista imunológico, o propagermanio ativa macrófagos, células T, especialmente células T citotóxicas e células NK, melhora várias citocinas, incluindo interferões (IFNs), especialmente IFN- γ e interleucina-2, e tem uma atividade antineoplásica numa ampla gama de tumores em vários modelos animais, possivelmente através de uma ação imunoestimulante. Se o propagermanio reforça o sistema de vigilância das células cancerosas ativando as células NK, pode-se presumir que reduza o desenvolvimento de alterações neoplásicas no fígado (Hirayama *et al.*, 2003).

Embora os mecanismos de ação deste fármaco ainda não tenham sido completamente compreendidos, sabe-se que este fármaco não inibe a atividade do MCP-1 nem a ligação do MCP-1 ao CCR2, mas liga-se aos péptidos N-terminais do CCR2 e tem como alvo as proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancoradas que estão intimamente associadas ao CCR2 e interferem com a quimiotaxia de monócitos induzida por MCP-1, suprimindo desta forma a função do CCR2. Yokochi *et al.* demonstraram que a fosfolipase C, ao separar seletivamente a GPI do CCR2, elimina os efeitos do propagermanio, o que indica que o fármaco pode atuar através da GPI ancorada (Tamura *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2002). O propagermanio impede danos nos tecidos através da inibição do recrutamento de monócitos (Yokochi *et al.*, 2001).

O MCP-1 e o CCR2 têm um papel crucial no recrutamento de células imunológicas (macrófagos/monócitos) para o tecido adiposo branco e para o fígado, e são cruciais no desenvolvimento da resistência à insulina e da esteatose hepática em ratos obesos induzidos pela dieta, promovendo assim a expressão desregulada de adipocinas no tecido adiposo e a inflamação associada à esteato-hepatite não alcoólica (Mulder *et al.*, 2017; Prospero *et al.*, 2014).

O MCP-1 promove a migração e ativação de monócitos, liga-se ao CCR2 e ambos podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da inflamação crônica e no recrutamento e retenção de macrófagos nas lesões ateroscleróticas, dado que a expressão de CCR2 se encontra aumentada em monócitos de pacientes que sofram de hipercolesterolemia (Yamashita *et al.*, 2002; Yokochi *et al.*, 2001).

Os macrófagos são fenotipicamente heterogêneos e caracterizam-se com base no seu estado de polarização como “macrófagos pró-inflamatórios (M1)” ou “anti-inflamatórios (M2)”. A proporção de macrófagos M1/M2 pode ser particularmente importante no desenvolvimento da resistência à insulina, e a diminuição da quantidade de macrófagos M1 é suficiente para melhorar a resistência à insulina associada à obesidade. No entanto, a dieta gorda aumenta a relação M1/M2 em diferentes tecidos e o propagermanio poderá neutralizar esse efeito (Mulder *et al.*, 2017).

Estudos anteriores indicam que o propagermanio não afeta a função de outras quimiocinas, como por exemplo a IL-8, à exceção de MCP-1 e da proteína quimiotática de monócitos 3, que são ligandos do CCR2, o que sugere que o efeito inibitório do propagermanio na migração dos monócitos é específico para o CCR2 (Yamashita *et al.*, 2002; Yokochi *et al.*, 2001).

Quando tomado por via oral, o propagermanio é absorvido de forma eficiente e excretado principalmente como uma molécula de polímero não metabolizado. Nos seres humanos, o propagermanio administrado oralmente ou de forma intravenosa, com uma dose de 50 mg/kg durante 6 meses, não causou efeitos adversos em pacientes com cancro (Hirayama *et al.*, 2003). Os potenciais efeitos tóxicos do propagermanio foram amplamente estudados e a dose letal (DL50) do propagermanio em ratinhos, por administração intraperitoneal, foi de 2,8 g/kg de peso corporal. Não foram observados efeitos significativos sobre o peso ou sobre a histologia dos órgãos principais em ratos tratados com 500-1000 mg/kg/dia de propagermanio, por administração intraperitoneal, ao longo de vários meses (Hirayama *et al.*, 2003).

Estudos anteriores relatam que o propagermanio não afeta o peso corporal, pode aumentar os níveis plasmáticos de adiponectina e diminuir os de insulina, não altera nem os níveis de triglicérides no plasma nem os de colesterol total e suprime a inflamação do tecido adiposo pela inibição da infiltração de macrófagos no tecido adiposo, bem como a diminuição da expressão do TNF- α , o que se traduz numa melhoria da obesidade (Mulder *et al.*, 2017; Prospero *et al.*, 2014; Tamura *et al.*, 2008).

O tratamento com propagermanio aumenta a expressão do transportador de glicose 2 e 4 (GLUT2 e GLUT4, respetivamente) no tecido adiposo, fígado e músculo e, por isso, a ação da insulina é melhorada, assim como a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose (Tamura *et al.*, 2008). Assim, a resistência à insulina pode ser melhorada através do tratamento com propagermanio, possivelmente devido à supressão da inflamação do tecido adiposo e aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina. Há estudos que relatam que o propagermanio diminui o influxo de FFA para o fígado e suprime acentuadamente a inflamação no fígado pela diminuição da expressão de MCP-1 e do TNF- α , bem como diminui a lipogénese, o que se traduz na melhoria da esteatose hepática (Tamura *et al.*, 2008). No entanto, o impacto destes efeitos em termos vasculares pode também ser grande e será, por isso, avaliado.

Dado o potencial deste composto a aumentar a sensibilidade à ação da insulina e a suprimir as condições inflamatórias, as potencialidades deste composto serão avaliadas em termos vasculares e perivasculares, dado que não existe nenhum estudo a abordar este assunto.

1.8. Objetivos

Dado que a prevalência da diabetes está a aumentar em todo o mundo, e as doenças macrovasculares associadas representam um elevado custo socioeconómico em países industrializados, é necessária a descoberta de novos fármacos eficazes, assim como novos alvos terapêuticos.

Pretende-se com este estudo investigar o papel do tecido adiposo perivascular na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2, bem como caracterizar alguns dos principais mecanismos de ação associados. Será também estudado o efeito de um anti-inflamatório, o propagermanio, na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2, a sua

ação no tecido adiposo perivascular e seu impacto funcional. Para tal, serão utilizados modelos animais de diabetes tipo 2.

É esperado que, na presença do anti-inflamatório, seja melhorada a disfunção endotelial, assim como a inflamação do tecido adiposo perivascular, recuperando o seu fenótipo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes químicos e imunológicos

Os reagentes utilizados na preparação de soluções, bem como os restantes compostos não referenciados na seguinte lista, foram adquiridos às seguintes 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 no trabalho

Dieta padrão A03	Scientific Animal Food & Engineering, França
Dieta gorda A03 + 20% Manteiga de cacau + 1,25% Colesterol	Scientific Animal Food & Engineering, França
Glicose 30%	Labesfal, Portugal
Insulina (Humulin Regular 100 UI/mL)	Lilly, EUA
Propagermanio	Sigma-Aldrich, EUA

Tabela 2: Composição da dieta padrão usada neste trabalho

Dieta padrão A03 (SAFE, França)		
2830 Kcal/kg	Kcal provenientes de cada constituinte (%)	Quantidade de cada constituinte presente na dieta (%)
Proteínas	25,2	21,4
Lípidos	13,5	5,1
Hidratos de carbono	61,5	52

Tabela 3: Composição da dieta gorda usada neste trabalho

Dieta gorda A03 + 20% Manteiga de cacau + 1.25% Colesterol (SAFE, França)		
4482 Kcal/kg	Kcal provenientes de cada constituinte (%)	Quantidade de cada constituinte presente na dieta (%)
Proteínas	11	12,3
Lípidos	46,4	23,1
Hidratos de carbono	42,6	47,8

2.2. Modelos animais e tratamentos

Para o desenvolvimento deste estudo, recorreu-se a dois modelos animais diferentes: como modelo de diabetes tipo 2, ratos machos Goto-Kakizaki (GK) e como modelo controlo, ratos machos saudáveis Wistar (W). As estirpes de animais utilizadas descendem de colónias locais (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e foram mantidas numa sala com ambiente ventilado, com ciclos de 12 horas de luz/ 12 horas de escuridão, com temperatura entre 21 e 24°C e humidade controlada (50-60%).

Os ratos GK foram divididos em quatro grupos de estudo: grupo controlo (GK C0); grupo controlo tratado com 50 mg/kg de propagermanio (GK CT); grupo de animais alimentados com uma dieta rica constituída por 50 Kcal % de gordura (GK H0) e ainda um grupo de animais alimentados com uma dieta rica em gordura e tratado com 50mg/kg de propagermanio (GK HT) (figura 10). O propagermanio foi administrado por via oral, durante 3 meses, até ao dia do sacrifício.

Durante o estudo, todos os animais tiveram livre acesso a ração e água, sendo de ressaltar que todos os procedimentos experimentais realizados nos animais cumprem a Lei Portuguesa para a experimentação de animais em laboratório.

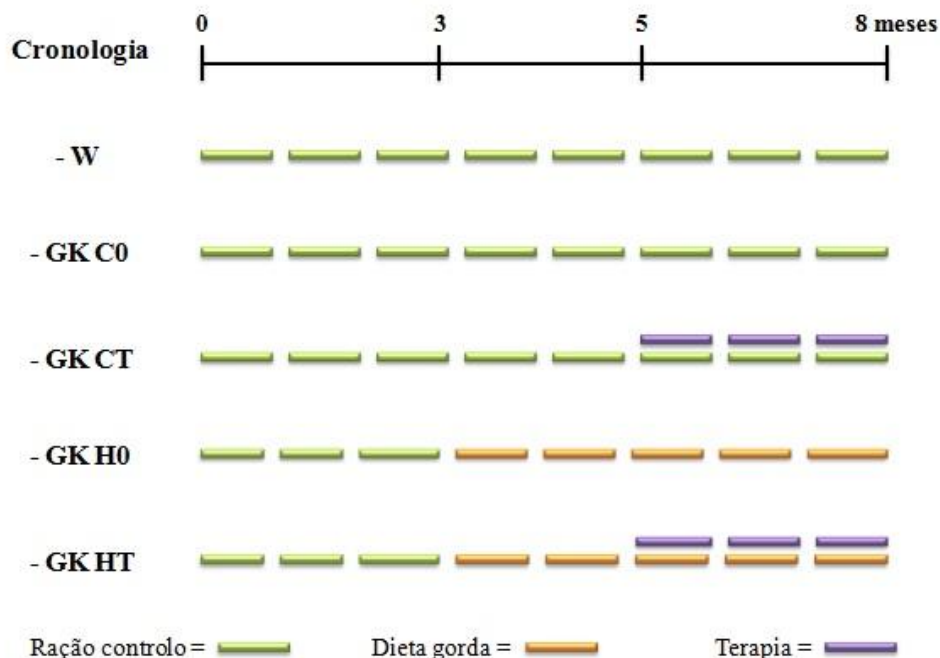


Figura 10: Grupos experimentais

2.2.1. Peso corporal e glicemia

Antes de serem sacrificados, os animais passaram por diversas avaliações *in vivo*. O peso corporal dos animais sujeitos a dieta gorda foi monitorizado, semanalmente, durante o estudo, desde o início da dieta até ao dia do sacrifício, com o objetivo de verificar a sua evolução com a ingestão da dieta gorda. Também foi monitorizada a quantidade de ração que sobrava e a quantidade de ração que era disponibilizada para a semana seguinte. No final do estudo, aos 8 meses de idade, todos os animais dos diferentes grupos foram pesados. A glicemia foi determinada antes da administração da dieta gorda, antes do período de terapêutica e no dia do sacrifício dos animais. Recolheu-se sangue da veia da cauda e determinou-se a glicemia após um jejum de 16-18h, pelo método da glicose-oxidase, através do uso de um glicómetro (Glucometer-Ellite-Bayer, Portugal S.A.) e tiras de teste compatíveis (Bayer, Portugal S.A.). Os níveis de glicose no sangue total foram expressos em mg/dL.

2.2.2. Prova de tolerância à glicose e prova de tolerância à insulina

Realizaram-se provas de tolerância à glicose intraperitoneal (PTGIP), em que os ratos foram mantidos em jejum (16-18h) durante a noite, e antes de serem realizadas as medições periódicas receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (1,75 g/Kg peso). Para a determinação da quantidade de glicose recorreu-se ao método da glicose-oxidase, através do uso de um glicómetro (Glucometer-Ellite-Bayer, Portugal S.A.) e tiras de teste compatíveis (Bayer, Portugal S.A.) e o sangue foi recolhido a partir da veia da cauda. Os níveis de glicose obtidos no sangue total foram expressos em mg/dL. A quantidade de glicose foi medida em jejum e ao fim de 1 e 2 horas após a injeção de glicose. Também se realizou a prova de tolerância à insulina (PTI), onde os ratos foram sujeitos a um determinado período de tempo em jejum (6h), e depois foi injetada uma concentração de insulina intraperitoneal diluída em soro fisiológico (Humulin Regular 0,25 U/mL/Kg). Após a injeção, foram realizadas as medições periódicas de glicose ao fim de 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, através do método da glicose-oxidase já explicitado.

2.2.3. Determinação dos níveis sistêmicos de colesterol total e de triglicerídeos

Os níveis sistêmicos dos parâmetros lipídicos (colesterol total e triglicerídeos) foram obtidos por analisador automático e expressos em mg/dL, tendo sido determinados no início e no final da administração da dieta gorda e no início e no final do período de terapêutica.

2.2.4. Colheita de sangue

Para a determinação de parâmetros sanguíneos, recolheram-se amostras de sangue dos animais após um jejum de 16-18h. Os animais foram anestesiados, por via intramuscular, com cloridrato de cetamina (75 mg/Kg) e o sangue foi recolhido por punção cardíaca quando o animal já se encontrava adormecido e dessensibilizado, permitindo o decorrer do procedimento sem qualquer sofrimento.

Para avaliação de parâmetros séricos e plasmáticos, as amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 g, durante 15 minutos, a 4°C, sendo posteriormente o soro e o plasma aliqüotados e armazenados a -80°C até ao seu processamento.

2.2.5. Sacrifício dos animais e recolha de órgãos

Como referido, os animais foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical. Foi medido o comprimento nasoanal, para o cálculo do Índice de Lee, um índice de massa corporal utilizado em roedores, obtido através da seguinte fórmula: razão da raiz cúbica do peso corporal (gramas) sobre o comprimento nasoanal (centímetros) multiplicada por 1000.

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 torácica foi dividida em 2 segmentos com, aproximadamente, 4 mm de comprimento, e a restante foi congelada em azoto líquido e armazenada a -80°C para posteriores análises, assim como o tecido adiposo perivascular que a rodeava. Um dos segmentos foi preservado com tecido adiposo perivascular numa matriz criopreservante (OCT) para posteriores estudos histológicos e o outro segmento foi colocado numa solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 119,0; KCl 4,7; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,2; glicose 11,0, o pH

foi aferido a 7,4 e a solução esteve constantemente a ser gaseada (95% de O₂ e 5% CO₂). Os segmentos arteriais (com e sem PVAT) foram então montados num sistema a 37°C, com a tensão controlada para os estudos isométricos.

2.2.6. Estudos Isométricos

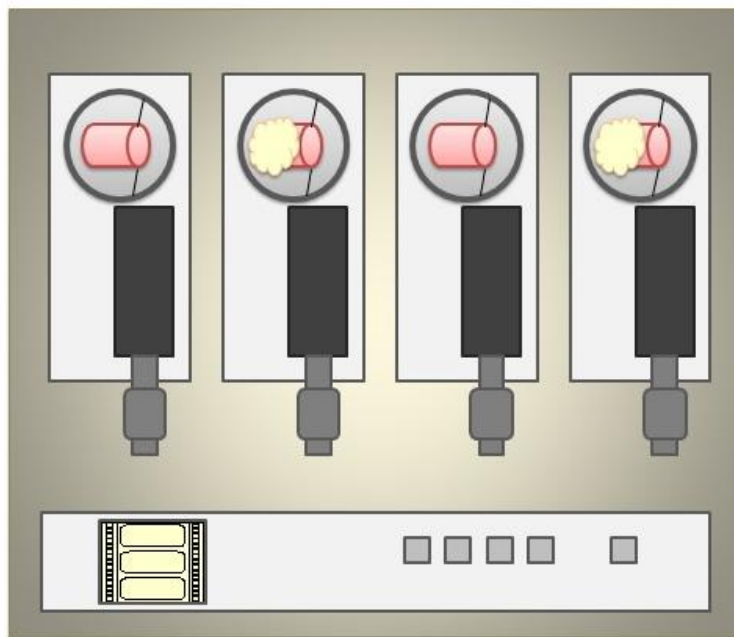


Figura 11: Esquema de montagem das artérias com e sem tecido adiposo perivascular nas câmaras de órgãos individuais

Os segmentos de anel da artéria aorta torácica (4 mm) foram montados com e sem tecido adiposo perivascular entre os ganchos de aço inoxidável 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% O₂ e 5% CO₂. Os anéis da 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 (figura 11).

Depois do equilíbrio, as câmaras foram esvaziadas e todos os vasos sofreram uma constrição com uma solução de fenilefrina (Phe 3 µM), durante 10 minutos, realizando-se, de seguida, o estudo de relaxamento dependente do endotélio com adições

cumulativas de acetilcolina (ACh, 10^{-9} a 10^{-3} M) (tabela 4), em intervalos de 4 minutos, de forma a avaliar a vasodilatação dependente do endotélio.

De seguida, substituiu-se a solução das artérias por uma solução de Krebs-Henseleit com N^wNitro-L-arginina metil éster (L-NAME 300 μ M), um inibidor da produção de NO, nos poços individuais no banho de órgãos e após incubação de 15 minutos, contraíram-se as artérias com uma solução de Krebs-Henseleit com L-NAME (300 μ M) e Phe (3 μ M), avaliando-se a resposta das artérias à acetilcolina, 10^{-9} a 10^{-3} M.

Substituiu-se novamente a solução das artérias por uma solução de Krebs-Henseleit com L-NAME (300 μ M) e indometacina (10 mM), que inibe a síntese de prostaglandinas, e após 15 minutos de incubação, contraíram-se as artérias com uma solução de Krebs-Henseleit com L-NAME (300 μ M), indometacina (10 mM) e Phe (3 μ M) e avaliou-se a resposta das artérias à acetilcolina, 10^{-9} a 10^{-3} M.

A seguir, as câmaras foram esvaziadas e estabilizaram-se as artérias com solução de Krebs-Henseleit. Após o retorno ao equilíbrio (estado basal) contraíram-se as artérias com endotelina (ET-1) e realizou-se o estudo de contração dependente do endotélio com adições cumulativas de endotelina (ET-1, 10^{-6} a 10^{-5} M) (tabela 5), em intervalos de 10 minutos.

Por fim, substituiu-se a solução das artérias por uma solução de Krebs-Henseleit, durante 10 minutos, e mudou-se a solução até as artérias voltarem ao estado basal.

Após o retorno ao equilíbrio, contraíram-se as artérias durante 10 minutos com uma solução de Krebs-Henseleit com Phe (3 μ M), e, de seguida, avaliou-se a resposta de relaxamento induzido pelo dador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP, 10^{-9} a 10^{-6} M), com adições cumulativas em intervalos de 3 minutos. O SNP é um dador de NO e é usado como um agonista para avaliar a vasodilatação independente do endotélio (tabela 6).

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 μ M). Os valores de EC₅₀ foram determinados através de uma equação obtida a partir da análise de regressão da curva dose-resposta. No final foram construídas as curvas cumulativas dose-efeito para as diferentes condições determinando a relação entre dose e eficácia.

Tabela 4: Curva dose-resposta à ACh

Sequência de adição	Concentração final
ACh1	1 nM
ACh2	10 nM
ACh3	100 nM
ACh4	1 μ M
ACh5	10 μ M
ACh6	100 μ M
ACh7	1 mM

Tabela 5: Curva dose-resposta à ET-1

Sequência de adição	Concentração final
ET-4	0,025 μ M
ET-5	0,025 μ M
ET-6	0,05 μ M
ET-7-8	0,15 μ M

Tabela 6: Curva dose-resposta ao SNP

Sequência de adição	Concentração final
SNP1	1 nM
SNP2	2 nM
SNP3	7 nM
SNP4	20 nM
SNP5	70 nM
SNP6	889 nM
SNP7	8,9 μ M
SNP8	89 μ M

2.2.7. Determinação dos níveis de hemoglobina A1c

Os níveis de hemoglobina A1c foram determinados no plasma dos animais através de um kit de ELISA (Rat glycated hemoglobina A1c ELISA kit, CUSABIO). Os níveis de hemoglobina A1c foram expressos em ng/mL.

2.2.8. Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de experiências (n). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA I e II) para um intervalo de confiança de 95%, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Peso corporal e glicemia

Quando se avalia o efeito da ingestão de uma dieta gorda durante 3 meses, é fundamental controlar o peso corporal dos animais. Num estudo em que também se avalia o estado da diabetes tipo 2, é importante monitorizar a glicemia em jejum, uma vez que este é um dos parâmetros cruciais nesta patologia.

De acordo com a figura 12, pode constatar-se que os animais diabéticos alimentados com a dieta gorda tiveram uma evolução uniforme de peso, atingindo valores superiores comparativamente aos animais diabéticos controlo alimentados com a dieta padrão, apesar de não apresentarem diferenças estatisticamente significativas.

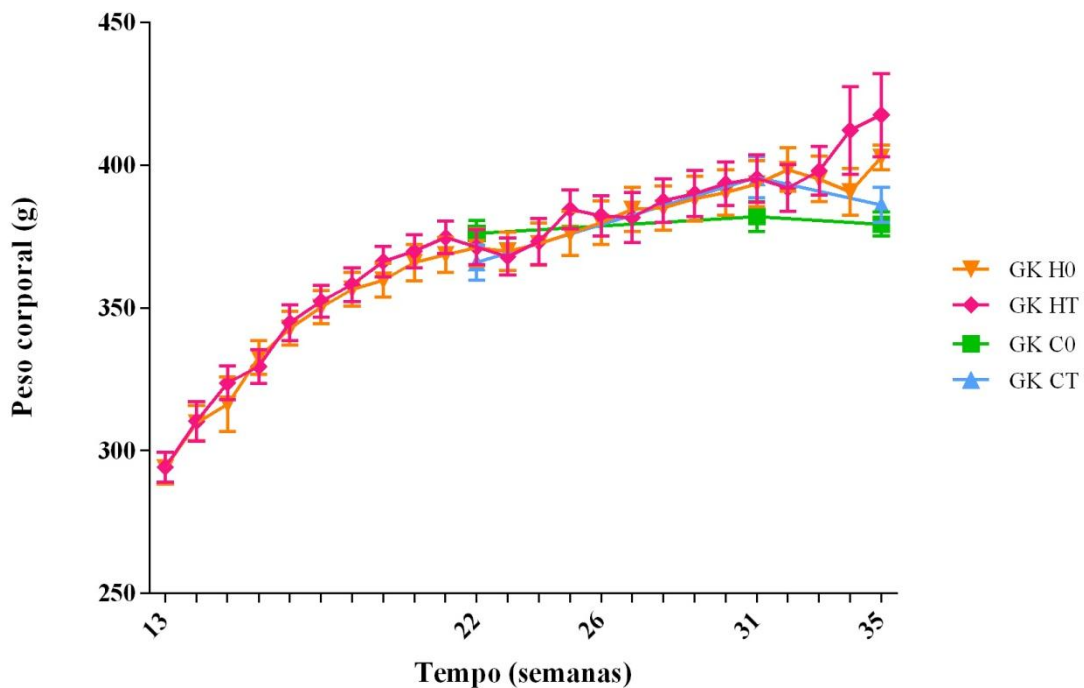


Figura 12: Peso corporal dos animais desde os 3 meses de idade até aos 8 meses (GK H0 e GK HT) e desde os 5 meses de idade até aos 8 meses (GK C0 e GK CT). Na figura está representado o efeito da dieta gorda no peso corporal dos animais diabéticos sujeitos à dieta gorda relativamente aos animais diabéticos controlo sujeitos à dieta padrão (n=12-16).

Analisando o peso corporal final atingido por todos os animais aos 8 meses (tabela 7), pode verificar-se que os animais W apresentaram um maior peso corporal relativamente aos restantes grupos, uma característica desta estirpe. Assim, os grupos GK C0 e GK CT, apresentaram um peso corporal, cerca de 17% inferior, quando comparados com o grupo W ($p < 0,001$). O grupo GK H0, apresentou uma diminuição

significativa de cerca de 14% do peso corporal, em comparação com o grupo W ($p<0,001$), e, no grupo GK HT, a diminuição significativa foi de, aproximadamente, 13% do peso corporal, comparativamente ao grupo W ($p<0,01$). Apesar de não ser estatisticamente significativo, os animais diabéticos alimentados com dieta gorda alcançaram um peso final ligeiramente superior ao dos animais diabéticos controlo alimentados com a dieta padrão.

Tabela 7: Peso corporal final aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos de animais em estudo; ** $p<0,01$, * $p<0,001$ relativamente ao grupo W**

	W (n=7)	GK C0 (n=16)	GK CT (n=12)	GK H0 (n=14)	GK HT (n=12)
Peso corporal final 8m (g)	458,5±23,88	379,3±4,23***	386,1±6,21***	393,3±8,11***	400,1±8,13**

No que diz respeito à glicemia, após um jejum de 16h (figura 13), verificou-se um aumento significativo nos animais diabéticos controlo (GK C0) e, nos animais diabéticos alimentados com a dieta gorda (GK H0), ($p<0,01$) quando comparados com os animais W. Todos os grupos de animais diabéticos apresentaram um aumento dos valores dos níveis de glicose em jejum, comparativamente com os animais controlo não diabéticos (W), o que era expectável, uma vez que se trata de animais diabéticos.

Os níveis de glicose após um jejum de 6h, na figura 14, refletem alterações no metabolismo hepático da glicose e mostram o efeito da dieta gorda, onde os grupos GK H0 e GK HT apresentaram níveis superiores de glicose relativamente a todos os restantes grupos. Assim, os grupos de animais alimentados com dieta gorda apresentaram um aumento muito significativo dos níveis de glicose comparativamente ao grupo GK C0 ($p<0,05$), comparativamente ao grupo GK CT ($p<0,01$) e comparativamente ao grupo W ($p<0,0001$).

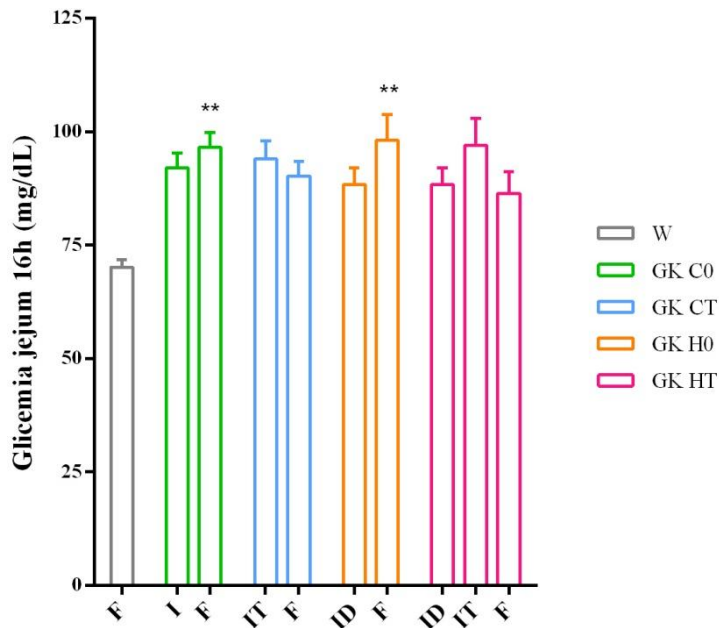


Figura 13: Glicemia após jejum de 16h no período inicial (I), antes da dieta (ID), antes da terapia (IT), e no final (F), nos diferentes grupos em estudo; **p<0,01 relativamente ao grupo W; Teste t realizado entre GK H0 (ID) e GK H0 (F) e entre GK HT (ID) e GK HT (F) para observar o efeito da dieta não foi significativo, assim como não foi significativo o Teste t realizado entre GK HT (ID) e GK HT (IT) e entre GK HT (IT) e GK HT (F) para ver o efeito da terapia; Os resultados estão apresentados como média ± e.p.m. (n=7-26)

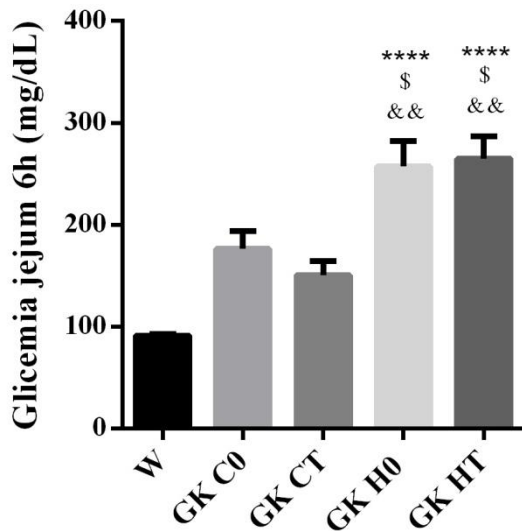


Figura 14: Glicemia após jejum de 6h, aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos em estudo; Os resultados estão apresentados como média ± e.p.m. (n=7-14) \$p<0,05 relativamente ao grupo GK C0; &&p<0,01 relativamente ao grupo GK CT; ****p<0,0001 relativamente ao grupo W

3.2. Hemoglobina A1c

A hemoglobina A1c é um indicador do perfil glicémico dos animais nos últimos 3 meses, e como foi administrada uma terapia durante 3 meses é importante verificar os seus valores nos diferentes grupos de animais (tabela 8). A hemoglobina A1c apresentou um aumento significativo nos animais alimentados com dieta gorda, relativamente aos animais W ($p < 0,05$), o que revela a disfunção provocada pela dieta gorda. Nos animais alimentados com dieta gorda e tratados com propagermanio, observou-se um aumento significativo deste parâmetro, relativamente ao grupo de animais W ($p < 0,01$) e GK C0 ($p < 0,01$).

Tabela 8: Hemoglobina A1c nos diferentes grupos em estudo; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ relativamente ao grupo W; \$\$\$ $p < 0,01$ relativamente ao grupo GK C0. Com a utilização de outro teste estatístico (teste t), GK C0 e GK CT apresentam diferenças estatísticas relativamente ao W ($p < 0,05$).

	W (n=4)	GK C0 (n=6)	GK CT (n=5)	GK H0 (n=5)	GK HT (n=7)
HbA1c (ng/mL)	0,18±0,02	0,34±0,04	0,58±0,13	0,64±0,12*	0,82±0,1***

3.3. Prova de tolerância à glicose e prova de tolerância à insulina

A resistência à insulina é uma das características da diabetes tipo 2. Assim, determinámos a prova de tolerância à glicose intraperitoneal (PTGIP) e à insulina (PTI) como métodos para avaliar a tolerância à glicose e a resistência periférica à insulina nas diferentes condições a que os grupos de animais foram sujeitos.

Analisando a PTGIP inicial, aos 3 meses de idade (figura 15A) e aos 5 meses de idade (figura 16A), os grupos de animais diabéticos apresentaram os níveis de glicose mais elevados (aos 60 e 120 minutos) com diferenças estatisticamente significativas comparativamente ao grupo W ($p < 0,0001$), como era expectável, uma vez que se trata de grupos de animais diabéticos.

Os grupos de animais GK H0 e GK HT apresentaram uma área abaixo da curva (AUC) maior, em comparação com o grupo controlo W ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respetivamente) (figura 15B), assim como os grupos de animais GK C0 e GK CT apresentaram uma AUC maior comparativamente ao grupo controlo W ($p < 0,001$)

(figura 16B), o que seria expectável uma vez que estamos perante animais diabéticos.

Avaliando a PTGIP final, aos 8 meses de idade (figura 17A), pode constatar-se que os animais W continuaram a ter os valores mais baixos de glicose comparativamente aos restantes grupos em estudo.

Nos grupos de animais diabéticos, observou-se um aumento significativo dos níveis de glicose, relativamente ao grupo controlo não diabético W ($p < 0,0001$), ao fim de 60 e 120 minutos. Este aumento nos níveis de glicose também se reflete na AUC, que é maior em todos os grupos de animais diabéticos (GK H0, GK HT, GK C0 e GK CT), comparativamente ao grupo de animais W ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respetivamente) (figura 17B). A dieta gorda não agravou a marcada intolerância à glicose dos GK C0 e o propagermanio não teve qualquer efeito neste parâmetro.

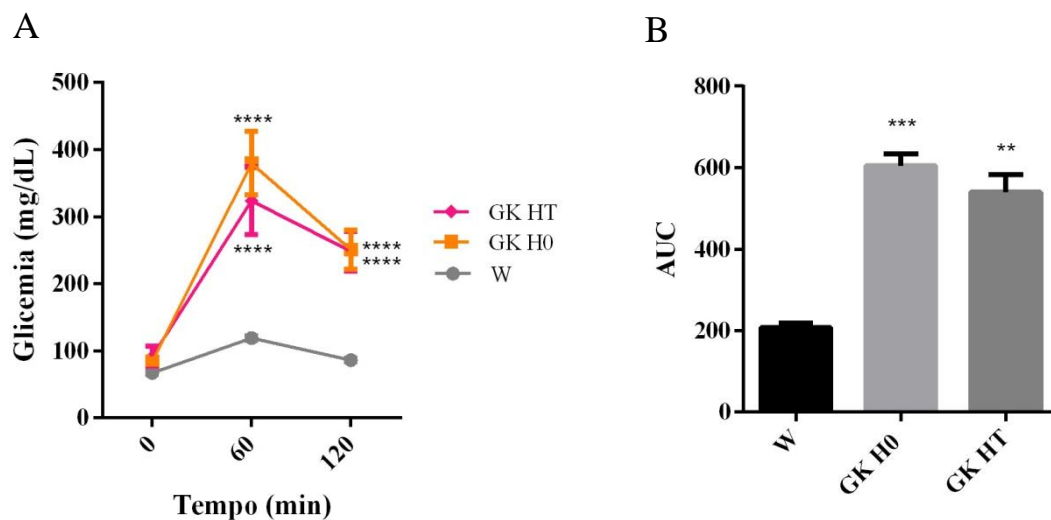


Figura 15: Prova de tolerância à glicose intraperitoneal aos 3 meses de idade. Na figura está representada a variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 60, 120 minutos) e a respetiva área abaixo da curva (AUC). Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=5-22). ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ relativamente ao grupo W**

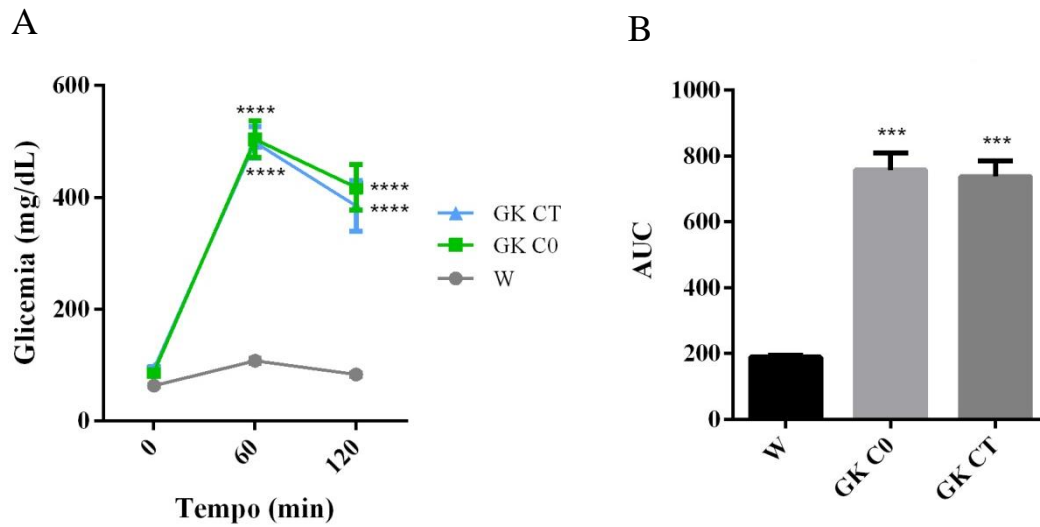


Figura 16: Prova de tolerância à glicose intraperitoneal aos 5 meses de idade. Na figura está representada a variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 60, 120 minutos) e a respectiva área abaixo da curva (AUC). Os resultados estão apresentados como média ± e.p.m. (n=4-13). ***p<0,001, **** p<0,0001 relativamente ao grupo W

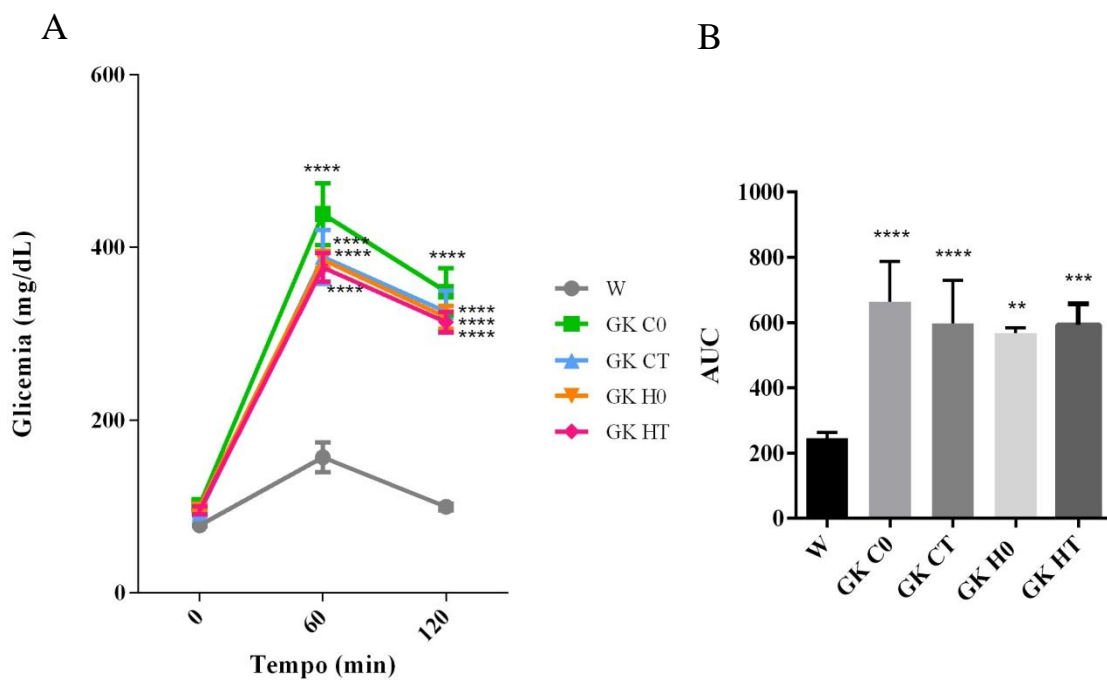


Figura 17: Prova de tolerância à glicose intraperitoneal final aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos em estudo. Na figura está representada a variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 60, 120 minutos) e a respectiva área abaixo da curva (AUC). Os resultados estão apresentados como média ± e.p.m. (n=3-14). **p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 relativamente ao grupo W

Tendo em conta a PTI aos 8 meses de idade (figura 18A), é evidente a disfunção provocada pela dieta gorda, uma vez que o grupo GK H0 tem uma AUC maior que os restantes grupos observando-se uma diferença significativa em relação ao grupo W ($p < 0,0001$), com os grupos GK C0 ($p < 0,001$) e GK CT ($p < 0,001$) (figura 18B). No grupo GK HT existe uma tendência para melhorar a PTI com uma diminuição da AUC, que é estatisticamente significativa relativamente ao grupo W ($p < 0,01$) e ao grupo GK H0 ($p < 0,05$) (figura 18B), o que indica que o propagermanio pode ter um efeito benéfico na melhoria da sensibilidade à insulina nos animais diabéticos. Os grupos de animais controlo diabéticos (GK C0 e GK CT) apresentaram um aumento da AUC estatisticamente significativo com o grupo W ($p < 0,05$) (figura 18B), que era expectável dadas as características deste modelo de diabetes tipo 2 com insulino-resistência. Neste caso não se verificou nenhum efeito da terapia no grupo GK CT. Todos os grupos de animais diabéticos, ao longo da prova, apresentaram diferenças estatísticas relativamente ao grupo de animais W, com níveis de glicose superiores. Os animais alimentados com dieta gorda (GK H0) apresentaram um aumento dos níveis de glicose estatisticamente significativo, ao longo da prova, quando comparados com os animais controlo diabéticos (GK C0). À exceção da medição efetuada aos 120 minutos, o grupo de animais GK H0 apresentou um aumento estatístico relevante dos níveis de glicose em todos os restantes períodos de tempo, relativamente ao grupo de animais GK CT (figura 18A).

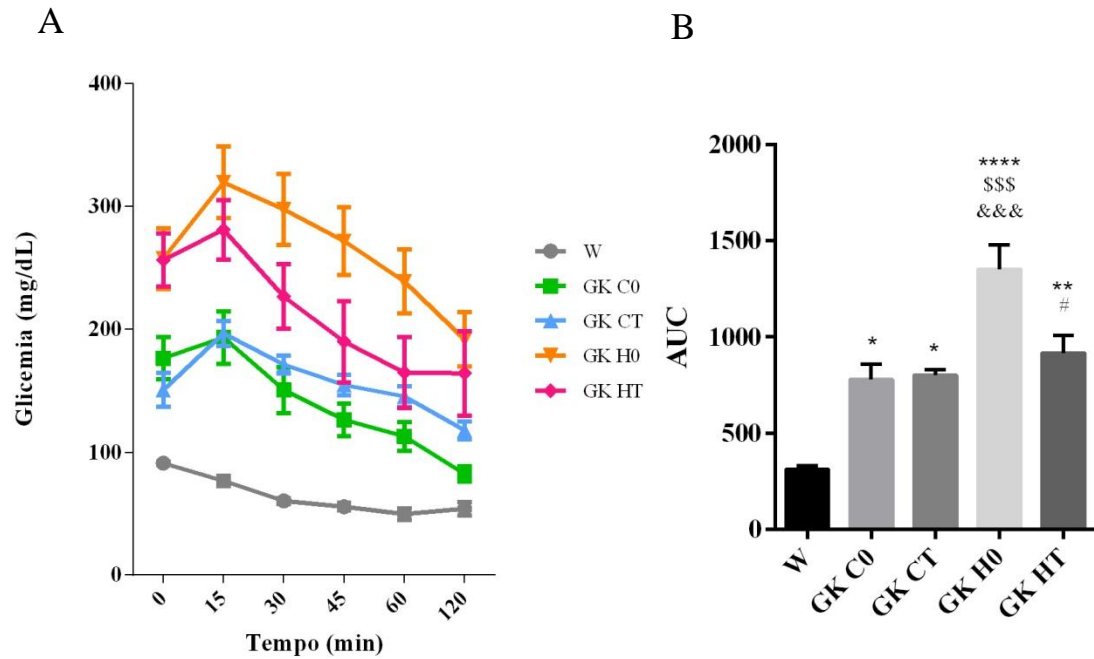


Figura 18: Prova de tolerância à insulina aos 8 meses de idade, nos diferentes grupos em estudo. Na figura está representada a variação dos níveis de glicose ao longo da prova (0, 15, 30, 45, 60, 120 minutos) e a respetiva área abaixo da curva (AUC). Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=7-14). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ relativamente ao grupo W; # $p < 0,05$ relativamente ao grupo GK H0; \$\$\$ $p < 0,001$ relativamente ao grupo GK C0; &&& $p < 0,001$ relativamente ao grupo GK CT

3.4. Perfil lipídico dos animais: níveis sistémicos de colesterol total e de triglicerídeos

Neste estudo, é importante a avaliação dos parâmetros lipídicos nos diferentes grupos de animais em estudo, dado que estes foram submetidos a uma dieta gorda e/ou à administração de uma terapia. Para tal, avaliou-se o nível de colesterol total e os triglicerídeos presentes no sangue dos animais.

Observou-se, assim, um aumento significativo dos níveis de colesterol total final, aos 8 meses, em todos os animais diabéticos ($p < 0,0001$) quando comparados com o grupo controlo não diabético W. Verificou-se também um aumento significativo dos níveis de colesterol total no grupo de animais alimentados com dieta gorda e tratados com propagermanio, tanto em comparação com o grupo controlo GK C0 ($p < 0,0001$) como com o grupo GK CT ($p < 0,0001$) e o grupo GK H0 ($p < 0,0001$), tal como podemos observar na tabela 9. No que diz respeito aos triglicerídeos, aos 8 meses de idade, verificou-se um aumento significativo em todos os grupos de animais diabéticos

($p < 0,0001$) relativamente ao grupo de animais W, como se pode observar na tabela 9. A dieta gorda não alterou significativamente o perfil lipídico dos animais e o propagermanio não surtiu qualquer efeito.

Tabela 9: Níveis sistémicos de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), correspondentes ao período inicial (I), antes da dieta (ID), antes da terapia (IT), e final (F), nos diferentes grupos em estudo; ** $p < 0,0001$ relativamente ao grupo W; \$\$\$ $p < 0,0001$ relativamente ao grupo GK C0; &&& $p < 0,0001$ relativamente ao grupo GK CT; ##### $p < 0,0001$ relativamente ao grupo GK H0**

	W (n=19)	GK C0 (n=11-15)		GK CT (n=12)		GK H0 (n=12-14)		GK HT (n=10-12)		
	F	I	F	IT	F	ID	F	ID	IT	F
CT (mg/dL)	80,89 ±2,62	160,62 ±2,48	157,73 ±1,25 ****	155,83 ±1,88	158,75 ±1,51 ****	171,5 ±2,25	168,72 ±4,51 ****	170,5 ±2,01	173,42 ±3,85	211,67 ±13,37 **** \$\$\$ &&& ####
TG (mg/dL)	84,89 ±6,15	131,27 ±9,23	143,14 ±4,42 ****	149,33 ±7,26	143,17 ±6,01 ****	136,29 ±7,70	168,86 ±10,18 ****	132,83 ±7,96	152,4 ±8,26	141 ±9,23 ****

3.5. Índice de Lee

Uma vez que os animais foram sujeitos a uma dieta gorda, é importante calcular o índice de massa corporal de roedores – Índice de Lee – que relaciona o peso corporal com o comprimento nasoanal. Verificou-se uma ligeira diminuição significativa do Índice de Lee nos grupos de animais diabéticos GK C0, GK CT, GK HT ($p < 0,05$) e GK H0 ($p < 0,001$), quando comparados com o grupo de animais W, como se pode observar na tabela 10. A dieta gorda e o propagermanio não tiveram qualquer efeito neste parâmetro.

Tabela 10: Índice de Lee nos diferentes grupos em estudo; * $p < 0,05$, * $p < 0,001$ relativamente ao grupo W**

	W (n=7)	GK C0 (n=6)	GK CT (n=12)	GK H0 (n=14)	GK HT (n=12)
Índice de Lee	303,79 ±6,49	290,21±2,47*	292,27±1,81*	286,2±0,89***	291,02±1,87*

3.6. Estudos funcionais

3.6.1. Efeito do propagermanio no relaxamento dependente do endotélio

O efeito do propagermanio na vasodilatação dependente do endotélio, isto é, dependente da produção de NO, foi analisado através da adição de concentrações crescentes de acetilcolina à artéria aorta, que foi previamente contraída com fenilefrina.

O grupo GK C0 apresentou uma diminuição da percentagem do relaxamento dependente do endotélio relativamente ao grupo W ($p < 0,001$), o que confirma a disfunção endotelial e o relaxamento dependente do endotélio prejudicado em animais diabéticos. Nos animais tratados com propagermanio (GK CT), há uma melhoria da percentagem do relaxamento em resposta a acetilcolina, que é estatisticamente significativa relativamente ao grupo GK C0 ($p < 0,001$), o que revela que a terapia atua na função endotelial.

Observou-se que os animais W não apresentaram diferenças estatísticas significativas relativamente ao grupo de animais controlo tratado com propagermanio (GK CT), as curvas apresentaram níveis de relaxamento idênticos, o que significa que o propagermanio normalizou a função endotelial e melhorou a sensibilidade de resposta à ACh.

Os animais alimentados com dieta gorda apresentaram um perfil de relaxamento semelhante aos animais diabéticos, sem diferenças estatisticamente significativas, o que indica que a dieta não agravou a disfunção endotelial, sendo coincidente com o facto de não se terem registado alterações no perfil lipídico dos animais. No entanto, o propagermanio teve um efeito menos proeminente na presença da dieta gorda, e por isso, a percentagem de relaxamento nos animais alimentados com dieta gorda e tratados com propagermanio é menor do que a percentagem de relaxamento dos animais que foram alimentados com dieta padrão e tratados com propagermanio, apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas (figura 19).

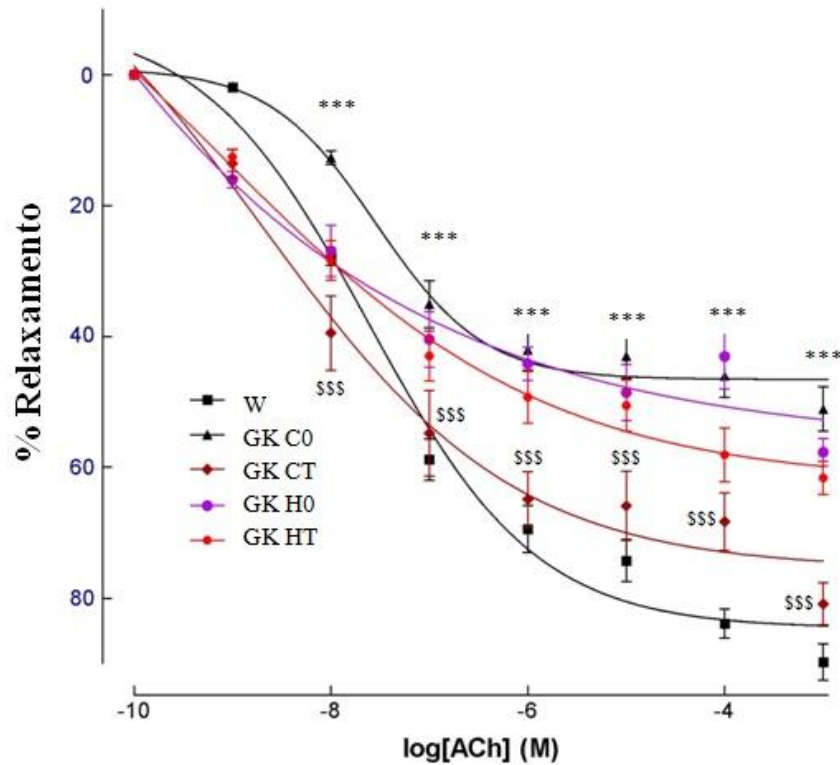


Figura 19: Curva dose-resposta à acetilcolina. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=10-19); ***p<0,001 em comparação com o grupo W; \$\$\$p<0,001 em comparação com o grupo GK C0

3.6.2. Efeito do propagermanio no relaxamento dependente do endotélio com adição de L-NAME

A incubação dos segmentos de aorta com um inibidor da eNOS, L-NAME, permite avaliar a vasodilatação arterial mediada por outros vasodilatadores (independente da produção de NO).

Os animais controlo diabéticos apresentaram percentagens de relaxamento em resposta a acetilcolina ligeiramente superiores relativamente aos animais W ($p<0,01$ e $p<0,001$), o que indica que o relaxamento que está a ocorrer nos animais diabéticos depende de outras substâncias vasodilatadoras, mas não do NO, que tem a sua produção inibida pelo L-NAME.

Os animais alimentados com dieta gorda apresentaram uma menor percentagem de relaxamento comparativamente ao grupo controlo W ($p < 0,05$), o que indica que a dieta também prejudicou a produção de outras substâncias vasodilatadoras pelo endotélio. Nos restantes grupos de animais, apesar de não se verificarem diferenças estatisticamente significativas, ocorreu uma tendência para a diminuição da percentagem de relaxamento, o que indica que o L-NAME diminuiu a sensibilidade de resposta à ACh, sem interferência da terapia (figura 20).

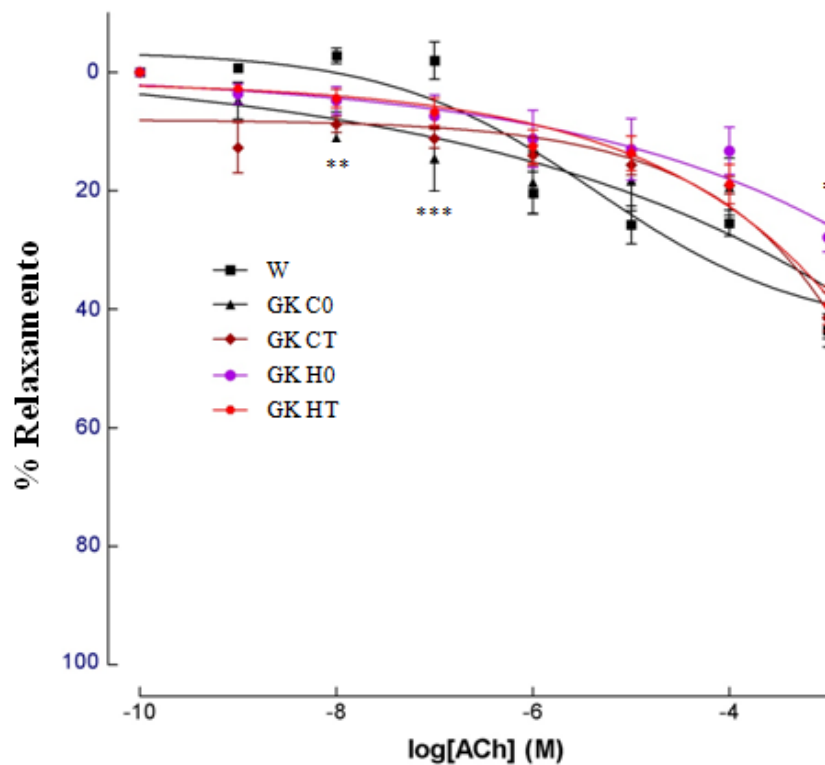


Figura 20: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=10-19); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo W

3.6.3. Efeito do propagermanio no relaxamento dependente do endotélio com adição de L-NAME e de indometacina

Os animais GK C0 apresentaram percentagens de relaxamento ligeiramente superiores relativamente aos animais W ($p < 0,05$ e $p < 0,01$), o que sugere que o relaxamento que está a ocorrer é independente de NO e PGI₂. Quando se comparam os animais GK CT com os animais W ($p < 0,01$ e $p < 0,001$), pode verificar-se que houve um

aumento da percentagem de relaxamento em resposta a acetilcolina comparativamente com os ratos GK C0 e com os ratos W, o que revela que a terapia induziu um perfil de relaxamento diferente, nomeadamente através do aumento da sensibilidade à ACh para concentrações menores.

Os animais GK CT não apresentaram diferenças estatisticamente significativas relativamente aos animais GK C0, ou seja, a terapia levou a que houvesse uma resposta mais rápida à ACh na presença dos inibidores, mas isso não afetou a percentagem máxima de relaxamento. Porém, a adição de indometacina (inibidor de ciclooxigenases) não alterou a percentagem de relaxamento em resposta a acetilcolina comparativamente à percentagem de relaxamento obtida anteriormente só com adição do L-NAME. O L-NAME diminuiu por si só a atividade vasodilatadora, independentemente da presença ou ausência de indometacina. Pode supor-se, então, que o papel do NO é mais preponderante na vasodilatação do que as ciclooxigenases na artéria aorta destes modelos animais (figura 21).

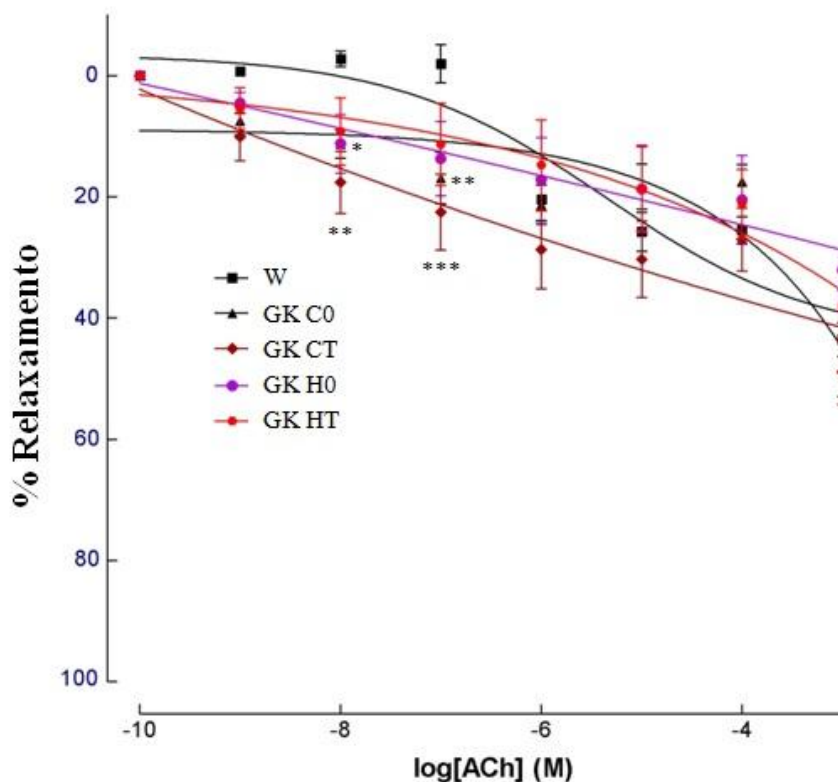


Figura 21: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME e de indometacina. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=10-19); *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001 em comparação com o grupo W**

3.6.4. Efeito do propagermanio no relaxamento independente do endotélio

Para se estudar o relaxamento independente do endotélio na artéria aorta adicionou-se o nitroprussiato de sódio (SNP), um dador exógeno de NO. Observou-se um relaxamento de praticamente 100% nas artérias, sendo de notar uma tendência de aumento da sensibilidade ao SNP nos animais alimentados com dieta gorda (GK H0 e GK HT), em que as artérias destes animais relaxam mais rapidamente para concentrações menores de SNP.

O grupo de animais GK H0 apresentou diferenças estatisticamente significativas relativamente ao grupo GK C0 ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ para uma concentração de SNP de 7 nM e 20 nM, respetivamente). Houve um aumento das diferenças estatisticamente significativas quando os animais são alimentados com a dieta gorda e sujeitos ao tratamento relativamente aos animais GK C0 ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ para uma concentração de SNP de 7 nM) e 20 nM, respetivamente) e relativamente aos animais GK H0 ($p < 0,001$ para um concentração de SNP de 7 nM).

O grupo GK CT apresentou um ligeiro aumento da percentagem de relaxamento independente do endotélio para concentrações menores de SNP relativamente ao grupo GK C0 ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ para uma concentração de SNP de 6 nM e 7 nM, respetivamente) (figura 22).

Em suma, o tratamento e a dieta gorda aumentaram a sensibilidade do relaxamento independente do endotélio.

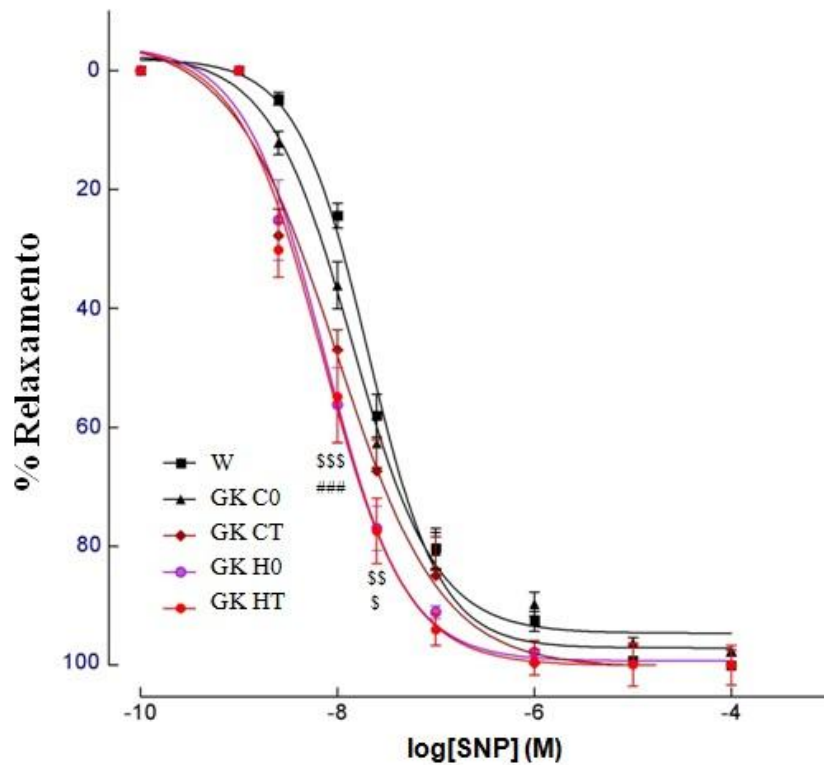


Figura 22: Curva dose-resposta ao nitroprussiato de sódio. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=10-19); \$p<0,05, \$\$p<0,01, \$\$\$p<0,001 em comparação com o grupo GK C0; ###p<0,001 em comparação com o grupo GK H0

3.6.5. Efeito do tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio

Os segmentos de artéria aorta foram montados nas câmaras com tecido adiposo perivascular e, de forma a avaliar o efeito deste tecido na vasodilatação dependente do endotélio, adicionaram-se concentrações crescentes de acetilcolina à artéria aorta, que foi previamente contraída com fenilefrina.

Foi possível observar um aumento da percentagem de relaxamento quando o PVAT se encontra presente nos animais W ($p<0,01$), relativamente aos animais W sem PVAT, o que comprova claramente o efeito vasodilatador do PVAT nos animais W (W+PVAT). Nos animais diabéticos, quando o PVAT está presente, ocorre uma diminuição na percentagem de relaxamento ($p<0,05$ e $p<0,01$), em comparação com os animais diabéticos sem PVAT (GK-PVAT), o que indica que o PVAT se encontra disfuncional, registando-se uma consequente perda do seu efeito vasodilatador (figura 23).

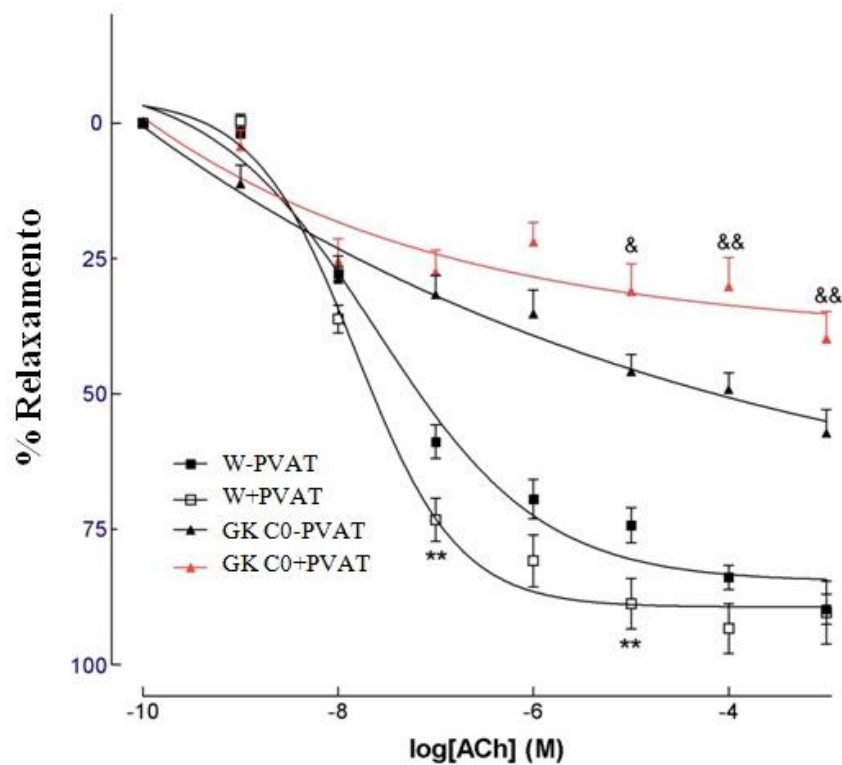


Figura 23: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença e ausência de tecido adiposo perivascular em animais W e GK C0. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=10-19); **p<0,01 em comparação com o grupo W-PVAT; &p<0,05, &&p<0,01 em comparação com o grupo GK C0-PVAT

3.6.6. Efeito do tecido adiposo perivascular na contração do endotélio em resposta à endotelina-1

A contração das artérias foi estudada através da adição de concentrações crescentes de endotelina-1. Verificou-se que, quando o PVAT se encontra presente nos animais W, as artérias apresentam uma menor percentagem de contração (p<0,001) relativamente aos animais W sem PVAT, o que evidencia o efeito anti-contrátil do PVAT. A presença do PVAT nos animais diabéticos diminuiu a sensibilidade da resposta à endotelina-1. Todavia, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas. A percentagem de contração das artérias nos animais diabéticos foi menor do que nos animais W-PVAT, o que seria de esperar uma vez que se trata de animais diabéticos (figura 24).

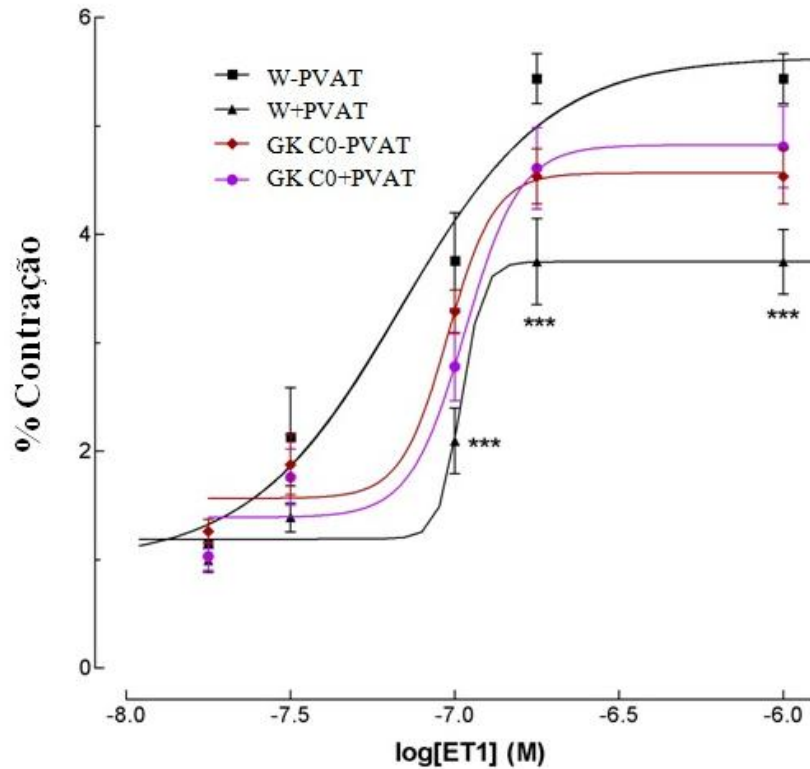


Figura 24: Curva dose-resposta à endotelina-1 na presença e ausência de tecido adiposo perivascular. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=10-19); ***p<0,001 em comparação com o grupo W-PVAT

3.6.7. Efeito do propagermanio no tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio

Verifica-se que a curva de relaxamento dos animais diabéticos sujeitos à terapia e com o PVAT se aproxima do perfil da curva de relaxamento dos animais W com PVAT, não existindo diferenças estatisticamente significativas, o que revela que o efeito vasodilatador do PVAT foi recuperado.

O grupo GK CT apresentou um aumento da percentagem de relaxamento dependente do endotélio quando o PVAT se encontra presente (p<0,001 para concentrações de ACh iguais ou superiores a 100 nM) relativamente ao grupo GK C0 também com o PVAT presente, o que confirma que, mais uma vez, a terapia recuperou a função do PVAT que se encontrava disfuncional (figura 25).

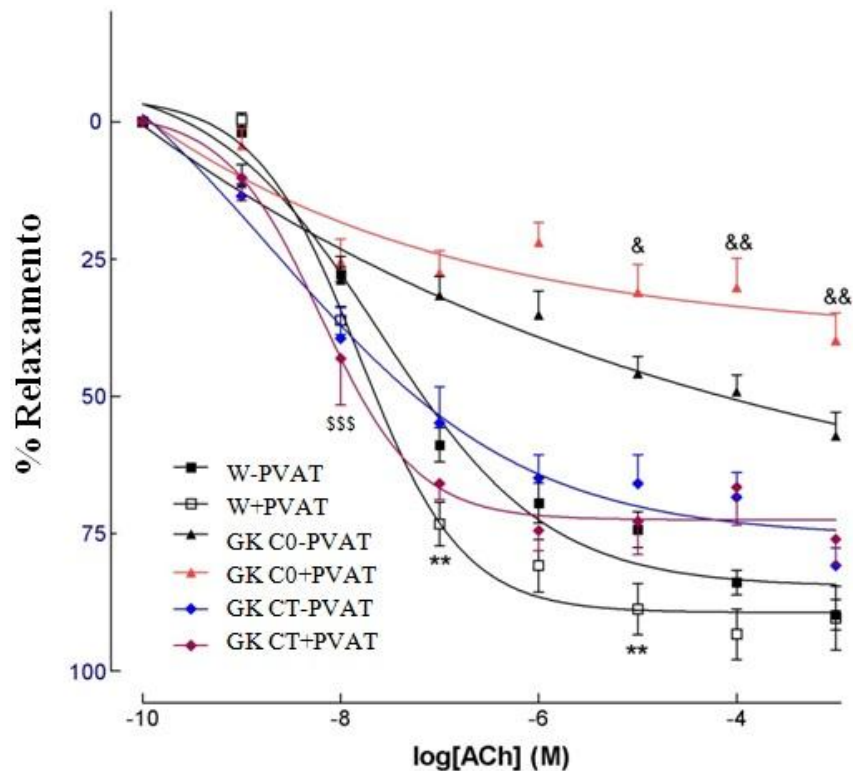


Figura 25: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença e ausência de tecido adiposo perivascular em animais W, GK C0 e GK CT. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. (n=10-19) **p<0,01 em comparação com o grupo W-PVAT; &p<0,05, &&p<0,01 em comparação com o grupo GK C0-PVAT; \$\$\$p<0,001 em comparação com o grupo GK C0+PVAT

3.6.8. Efeito do propagermanio no tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio em animais alimentados com dieta gorda

Quando o PVAT se encontra presente nos animais alimentados com dieta gorda, a percentagem de relaxamento diminui ($p < 0,05$) relativamente aos animais alimentados com dieta gorda e sem o PVAT presente, o que revela que a dieta prejudicou a ação vasodilatadora do PVAT. A presença do PVAT nos animais alimentados com dieta gorda e tratados com propagermanio levou a que a percentagem de relaxamento aumentasse ($p < 0,001$), relativamente aos animais alimentados com dieta gorda e com o PVAT presente, indicando que a terapia atuou ao nível do PVAT e recuperou a sua ação vasodilatadora.

Nos animais alimentados com dieta gorda e tratados com propagermanio a presença do PVAT provocou um desvio para a esquerda da curva de relaxamento desses animais, em comparação com os animais alimentados com dieta gorda e tratados com propagermanio, mas sem o PVAT presente. Este aumento da percentagem de relaxamento no grupo GK HT+PVAT apresenta diferenças estatisticamente significativas relativamente ao grupo GK HT-PVAT ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ para uma concentração de ACh de 100 nM e 1 μ M), que revelam o aumento da sensibilidade à ACh e a recuperação do efeito vasodilatador do PVAT.

Através da observação das curvas de relaxamento, pode constatar-se que os animais alimentados com dieta gorda apresentaram uma menor percentagem de relaxamento comparativamente aos animais alimentados com dieta gorda e tratados com propagermanio, o que confirma que a terapia melhora a função endotelial (figura 26).

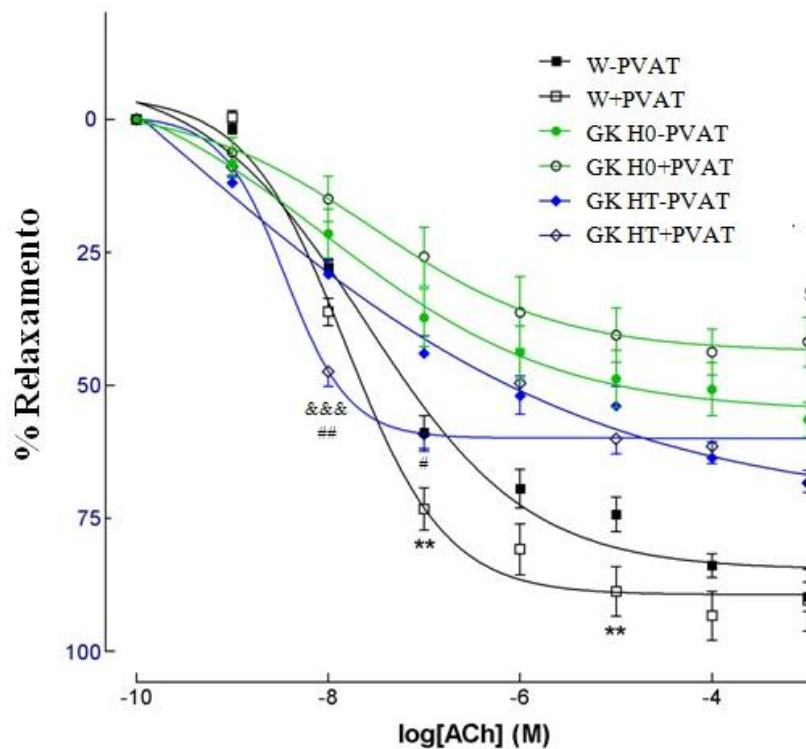


Figura 26: Curva dose-resposta à acetilcolina na presença e ausência de tecido adiposo perivascular em animais W, GK H0 e GK HT. Os resultados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n=10-19$); ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo W-PVAT; \$ $p < 0,05$ em comparação com o grupo GK H0-PVAT; &&& $p < 0,001$ em comparação com o grupo GK H0+PVAT; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo GK HT-PVAT

4. DISCUSSÃO

A diabetes tipo 2 é uma patologia cuja prevalência está a aumentar em todo o mundo, e por conseguinte, é necessário o estudo de novas abordagens terapêuticas que melhorem a qualidade de vida dos pacientes e reduzam as co-morbilidades associadas.

Neste estudo foi avaliado o papel do tecido adiposo perivascular, a eficácia terapêutica do propagermanio na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2 e o seu impacto perivascular. Para tal foram utilizados dois tipos de modelos animais e diferentes dietas. Utilizaram-se ratos normais (Wistar) alimentados com dieta padrão, ratos diabéticos não obesos (Goto-Kakizaki) alimentados com dieta padrão e ratos GK alimentados com uma dieta gorda, com o objetivo de simular os erros alimentares de uma população e agravar a disfunção endotelial já existente nos animais diabéticos. Foram avaliados diversos parâmetros *in vivo* como o peso corporal, o comprimento nasoanal (para o cálculo do Índice de Lee), o perfil lipídico (níveis sistêmicos de colesterol total e triglicéridos), os níveis de glicose em jejum, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (através de provas de tolerância à glicose e à insulina, respetivamente). Ao nível vascular foi estudado *ex vivo* o relaxamento dependente e independente do endotélio e a contração do endotélio em resposta à endotelina-1. Por fim, foram calculados os níveis de hemoglobina A1c.

Os resultados demonstraram que a administração do propagermanio, por via oral, não interferiu no peso dos animais e não alterou o índice de Lee, no entanto, melhorou os níveis da glicose em jejum e a resistência à insulina, não alterou os níveis de colesterol total e triglicéridos, melhorou a disfunção endotelial e recuperou o efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular.

Através da análise dos resultados verificou-se que a dieta gorda aumentou ligeiramente o peso corporal dos animais diabéticos comparativamente aos animais diabéticos que foram alimentados com a dieta padrão, apesar de este aumento não ser estatisticamente significativo. O propagermanio não afetou o peso corporal dos animais (GK CT e GK HT), o que está de acordo com a literatura onde foi recentemente descrito que um tratamento precoce e tardio com propagermanio não afeta o peso corporal (Mulder *et al.*, 2017).

Como já foi referido em vários estudos, animais alimentados com dietas ricas em gordura, para além do aumento de peso corporal apresentam alterações ao nível do perfil lipídico, tais como o aumento dos níveis de colesterol total e de triglicéridos sistêmicos (Funke *et al.*, 2014). No entanto, outros estudos relatam que a indução de

hipercolesterolemia em roedores pode ser difícil, uma vez que estes animais possuem uma maior fração de colesterol HDL, e a resposta do colesterol plasmático ao colesterol dietético é altamente variável entre e dentro das espécies animais (McNamara, 2000). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com o último estudo referenciado, onde apenas um grupo de animais (GK HT) aumentou significativamente os níveis de colesterol total em comparação com os restantes grupos de animais. Os triglicérides apresentaram, contudo, valores idênticos entre os animais diabéticos e não apresentaram diferenças estatísticas entre grupos, à exceção dos animais controlo W.

Com a administração da terapia não se verificaram alterações nos níveis de triglicérides, embora aumentem ligeiramente os níveis de colesterol total. Este aumento dos níveis de colesterol total não está de acordo com o que está descrito na literatura, pois foi relatado que o propagermanio não altera nem os níveis de triglicérides e nem os níveis de colesterol total (Tamura *et al.*, 2008). Esta discrepância pode dever-se ao facto de se tratar de diferentes modelos animais, com idades distintas e com diferentes regimes alimentares o que pode afetar estes resultados. Por outro lado, o colesterol total pode estar a aumentar porque aumenta a sua componente HDL, o que neste caso seria benéfico. As diferentes frações de colesterol (HDL, LDL e VDL) deverão, por isso, ser avaliadas para uma melhor interpretação dos resultados.

Uma vez que a diabetes tipo 2 se caracteriza por uma secreção deficiente de insulina e conseqüente condição de hiperglicemia, é apropriado a realização de provas de tolerância à glicose e prova de tolerância à insulina. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, uma vez que a AUC dos animais diabéticos é maior (Anyakudo & Omotayo, 2015), assim como os níveis de glicose após um jejum de 16h. Os ratos diabéticos GK que foram utilizados, à semelhança de outros modelos animais de diabetes, são intolerantes à glicose e insulino-resistentes. A dieta gorda não aumentou a AUC, o que coincide com o facto referido anteriormente. Os animais foram resistentes à dieta gorda, não agravaram grande parte dos parâmetros avaliados, o que confirma os resultados da função endotelial que indicam que os animais não ficaram mais disfuncionais do ponto de vista vascular. Contudo, verificou-se um aumento dos níveis de glicose após um jejum de 16h nos animais sujeitos à dieta gorda, tendo esses níveis diminuído aquando da administração do propagermanio. No que diz respeito aos níveis de glicose após um jejum de 6h, foram observadas alterações no metabolismo hepático da glicose e é possível ver o efeito da dieta gorda, tendo os animais GK H0 e GK HT

apresentado os níveis superiores. A terapia não teve um efeito significativo na prova de tolerância à glicose intraperitoneal.

No entanto, através dos resultados obtidos pode também comprovar-se a eficácia do propagermanio na melhoria da sensibilidade à insulina, uma vez que o grupo GK HT apresentou uma menor AUC em comparação com o grupo GK H0, o que está de acordo com a literatura e deve-se possivelmente à supressão da inflamação do tecido adiposo e aumento dos níveis plasmáticos de adiponectina, bem como ao aumento da expressão do transportador de glicose 2 e 4 pelo propagermanio em termos hepáticos e musculares (Tamura *et al.*, 2008).

A função do endotélio vascular está comprometida na obesidade e na diabetes tipo 2, o que leva à disfunção endotelial, ou seja, à incapacidade do endotélio manter a homeostase vascular, refletindo um desequilíbrio nas substâncias vasoativas derivadas do endotélio e está associada a vasoconstrição e a um ambiente pro-oxidante e pro-inflamatório (Hamilton & Watts, 2013; Zaborska *et al.*, 2016). Verifica-se a diminuição da biodisponibilidade do NO, uma redução da vasodilatação dependente do endotélio onde há modificação da atividade e desacoplamento da eNOS, desregulação hemodinâmica, aumento do *stress* oxidativo e formação de ROS, aumento da produção de fatores de crescimento, aumento da expressão de moléculas que são responsáveis pela adesão celular e de genes inflamatórios e aumento da permeabilidade do endotélio vascular (Qian & Fulton, 2013; Sena *et al.*, 2013).

No presente trabalho avaliou-se o efeito do propagermanio ao nível vascular, recorrendo a estudos funcionais utilizando segmentos da artéria aorta montados nas câmaras com e sem tecido adiposo perivascular.

Tendo em conta os resultados obtidos nos estudos funcionais, verificou-se que os animais diabéticos apresentaram uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio, induzido pela acetilcolina, quando comparados com o grupo de animais não diabéticos, como seria de esperar dado que a disfunção endotelial está associada à diabetes tipo 2 (Sena *et al.*, 2011). Este relaxamento é maior e acontece mais cedo no grupo de animais que foram tratados com propagermanio, tendo a função endotelial sido normalizada com a terapia e podendo dever-se ao facto de o propagermanio induzir alterações anti-inflamatórias (Mulder *et al.*, 2017).

A dieta gorda utilizada neste trabalho não agravou a disfunção endotelial, o que é coincidente com o facto de não terem havido alterações no perfil lipídico dos animais,

como já referido anteriormente e de acordo com estudos anteriores (Sena *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos no relaxamento induzido pela acetilcolina, após os segmentos de artéria aorta terem sido submetidos ao inibidor da enzima eNOS que sintetiza NO (L-NAME), estão de acordo com o esperado uma vez que a percentagem de relaxamento máximo diminuiu em todos os grupos de animais, o que indica que o L-NAME diminuiu a sensibilidade de resposta à ACh, sem interferência da terapia. No entanto, o relaxamento que ainda se verifica pode ser devido a outros fatores produzidos pelo endotélio, além do NO, como as prostaglandinas que são sintetizadas a partir de ácido araquidônico (AA) pelas ciclooxigenases, que através da ativação da adenilato ciclase promove a produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e o consequente relaxamento das células do músculo liso vascular (Zaborska *et al.*, 2016). O aumento das ciclooxigenases também se verifica na disfunção endotelial e na obesidade, e o consequente aumento da produção de TXA2 e redução da libertação de PGI₂ relaciona-se com o aumento da produção de prostaglandinas a partir do AA pela COX2, induzida por inflamação, daí o relaxamento que se observa na presença de L-NAME ser devido ao ambiente inflamatório proporcionado por estas condições (Lobato *et al.*, 2011).

Para além de se estudar o efeito da adição de L-NAME, também se avaliou a resposta do relaxamento do endotélio com a adição de L-NAME e de indometacina (inibidor de ciclooxigenases). Através dos resultados obtidos pode observar-se que a adição de indometacina não alterou a percentagem de relaxamento comparativamente à percentagem de relaxamento obtida anteriormente só com a adição de L-NAME, o que indica que o papel do NO é mais preponderante na vasodilatação do que as substâncias vasodilatadoras produzidas pelas ciclooxigenases. O relaxamento endotelial remanescente é devido a fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio que neste trabalho não foram inibidos.

Estudos relatam o relaxamento independente do endotélio através do aumento dos níveis de relaxamento mediados por nitroprussiato de sódio (SNP), que é um dador de NO exógeno e decompõe-se espontaneamente para produzir NO, atuando em seguida no músculo liso pela ativação da GCs (Chirkov & Horowitz, 2007; Yeh-Siang *et al.*, 2011). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo a literatura, onde se observa um relaxamento praticamente de 100% das artérias (Sena *et al.*, 2008; 2011). É de notar que o tratamento e a dieta gorda aumentaram a sensibilidade do relaxamento independente

do endotélio (desvio das curvas dose-efeito para a esquerda).

O tecido adiposo perivascular liberta uma grande variedade de moléculas biologicamente ativas que têm influência na vasculatura (Villacorta & Chang, 2015). Em condições normais, o PVAT exerce funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias, porém, na obesidade, devido à inflamação do PVAT, caracterizada pelo desequilíbrio entre as células pró e anti-inflamatórias, há indução da secreção anormal de adipocinas e produção de ROS (Lastra & Manrique, 2015). A redução da secreção de adiponectina a partir do tecido adiposo desempenha um papel importante no desenvolvimento de complicações vasculares associadas à diabetes tipo 2 (Padilla *et al.*, 2015).

Os segmentos de artéria aorta foram montados nas câmaras com tecido adiposo perivascular e os resultados deste trabalho estão de acordo com a literatura, dado que a presença do PVAT aumentou a percentagem de relaxamento nos anéis aórticos dos animais W. Nos animais diabéticos, quando o PVAT está presente houve uma diminuição da percentagem de relaxamento, o que confirma que este se encontra disfuncional e que perde o seu efeito vasodilatador.

O endotélio, além de produzir fatores vasodilatadores como o NO, também produz fatores vasoconstritores, como a endotelina-1 (ET-1) por exemplo (Edwards *et al.*, 2010; Félétou & Vanhoutte, 2006). A inflamação relacionada com a resistência à insulina e a diabetes tipo 2, reflete-se no aumento dos níveis séricos de ET-1 (Natali *et al.*, 2006). O PVAT, por sua vez, tem a capacidade de produzir prostaglandinas e atenuar a vasoconstrição arterial através da atenuação da resposta vascular de vários agonistas, como a ET-1. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, onde se pode observar que a presença do PVAT atenua a contração em resposta a endotelina-1, o que evidencia o seu efeito anti-contrátil (Aghamohammadzadeh *et al.*, 2016; Zaborska *et al.*, 2016).

Quando se observa o efeito do propagermanio no tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio, pode verificar-se que este recuperou o efeito vasodilatador do PVAT nos animais diabéticos. Este resultado pode dever-se ao mecanismo de ação do propagermanio na diminuição da infiltração de macrófagos no tecido adiposo e consequente redução dos níveis de citocinas inflamatórias (MCP-1) (Mulder *et al.*, 2017; Prospero *et al.*, 2014).

Foi também avaliado o efeito do propagermanio no tecido adiposo perivascular no relaxamento dependente do endotélio, em animais diabéticos com dieta gorda. Nestes é

possível observar-se que a dieta gorda prejudicou a ação vasodilatadora do PVAT, o que está de acordo com a literatura. Estudos existentes relatam que a inflamação do PVAT resulta em respostas vasodilatadoras anômalas, reduzindo o vasorelaxamento mediado pelo endotélio (Even *et al.*, 2014; Lastra & Manrique, 2015). Mais uma vez se pode observar o efeito benéfico do propagermanio, que aumentou a porcentagem de relaxamento nos animais alimentados com dieta gorda e com o PVAT presente, o que indica que a terapia atuou ao nível do PVAT, recuperou a sua ação vasodilatadora e aumentou a sensibilidade de resposta à acetilcolina, assim como ajudou na normalização da função endotelial, apesar do seu mecanismo de ação no PVAT ainda ser uma incógnita na literatura. No entanto, podemos sugerir que este inibidor de CCR2 produz efeitos benéficos porque muito provavelmente vai diminuir a infiltração de macrófagos no tecido perivascular, promovendo uma redução dos níveis de citocinas inflamatórias. Por outro lado, a melhoria da sensibilidade à insulina corrobora estes efeitos ao nível do tecido adiposo branco.

Os níveis de hemoglobina A1c (HbA1c) são bons indicadores do perfil glicémico dos animais e são um bom critério de diagnóstico para a diabetes. Este critério apresenta vantagens como menor vulnerabilidade a variáveis pré-analíticas e *stress*, menor dependência de variabilidade biológica e variação circadiana e ausência de interferência de alguns medicamentos que prejudicam o metabolismo da glicose (corticosteróides, β_2 -agonistas, antibióticos e diuréticos), mas também há desvantagens associadas tais como o risco de diagnosticar mal a diabetes em indivíduos com co-morbidades importantes (anemia, aumento do volume de células sanguíneas vermelhas ou doença renal terminal), bem como em pacientes com consumo elevado de álcool e anormalidades de glicação (isto é, glicação acelerada). Também foram levantadas algumas questões técnicas, incluindo a potencial interferência analítica sobre o valor medido da HbA1c devido à presença de variantes de hemoglobina, bem como uma maior imprecisão e custos associados do ensaio (Danese *et al.*, 2017).

Através dos resultados obtidos, pode afirmar-se que a dieta gorda aumentou os níveis de hemoglobina A1c, e conseqüentemente agravou a diabetes tipo 2. A terapia com propagermanio aumentou a concentração de HbA1. Este composto não parece ter um efeito proeminente no controlo glicémico nas nossas condições experimentais e, mesmo não tendo efeitos benéficos a este nível, tem efeitos vasculares importantes denotando outros mecanismos de ação. Por outro lado, deve-se também salientar que,

como foi anteriormente sugerido, as intervenções terapêuticas direcionadas para via MCP-1/CCR2 devem ser iniciadas precocemente para aumentar a sua eficácia (Mulder *et al.*, 2017). Assim, não podemos excluir que com outros protocolos terapêuticos poderíamos ter obtido outros resultados.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliámos o papel do tecido adiposo perivascular, a eficácia terapêutica do propagermanio na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2 e o seu impacto perivascular. Para tal foram utilizados ratos Wistar alimentados com dieta padrão, ratos GK alimentados com dieta padrão e ratos GK alimentados com uma dieta gorda. Os ratos GK apresentaram um aumento dos níveis de glicose em jejum e da AUC da prova de tolerância à glicose e da prova de tolerância à insulina.

Concluímos que a administração do propagermanio, por via oral, não interferiu no peso dos animais e não alterou o índice de Lee, no entanto, melhorou os níveis de glicose em jejum e a resistência à insulina, não alterou os níveis de colesterol total e triglicéridos, não teve um efeito significativo na prova de tolerância à glicose intraperitoneal, melhorou a sensibilidade à insulina e a disfunção endotelial neste modelo animal de diabetes tipo 2.

Confirmámos em anéis aórticos montados com tecido adiposo perivascular que o PVAT se encontrava disfuncional nos animais diabéticos. Muito provavelmente a perda do efeito vasodilatador do PVAT nestas condições deve-se ao desequilíbrio entre as células pró e anti-inflamatórias, à secreção anormal de adipocinas e à produção de ROS com atenuação do seu efeito anti-contrátil.

Concluímos ainda que o tratamento com propagermanio no PVAT foi benéfico, pois verificou-se uma recuperação do efeito vasodilatador do PVAT nos animais diabéticos. Esta recuperação pode dever-se ao mecanismo de ação do propagermanio na diminuição da infiltração de macrófagos no tecido adiposo e consequente redução dos níveis de citocinas inflamatórias (MCP-1).

O tratamento com propagermanio aumentou também a percentagem de relaxamento nos animais alimentados com dieta gorda e com o PVAT presente, ou seja, a terapia recuperou a ação vasodilatadora do PVAT, aumentou a sensibilidade de resposta à acetilcolina e normalizou a função endotelial.

Em suma, com este trabalho demonstrámos que na presença do propagermanio a disfunção endotelial foi melhorada e ocorreu uma recuperação do efeito anti-contrátil do tecido adiposo perivascular. Muito provavelmente o tecido adiposo perivascular está envolvido na inflamação e emerge como um novo tipo de tecido adiposo que participa na patogénese de doenças cardiovasculares, de forma independente, e surge como um potencial alvo terapêutico para a disfunção vascular relacionada com a diabetes tipo 2.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul-Ghani, M. A., Molina-Carrion, M., Jani, R., Jenkinson, C., & DeFronzo, R. A. (2008). Adipocytes in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance are resistant to the anti-lipolytic effect of insulin. *Acta Diabetologica*, 45(3), 147–150.
- Achike, F. I., To, N. H. P., Wang, H., & Kwan, C. Y. (2011). Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38(1), 1-10.
- Aghamohammadzadeh, R., Unwin, R. D., Greenstein, A. S., & Heagerty, A. M. (2016). Effects of Obesity on Perivascular Adipose Tissue Vasorelaxant Function: Nitric Oxide, Inflammation and Elevated Systemic Blood Pressure. *Journal of Vascular Research*, 52(5), 299–305.
- Almabrouk, T. A. M., Ewart, M. A., Salt, I. P., & Kennedy, S. (2014). Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *British Journal of Pharmacology*, 171(3), 595-617.
- Anyakudo, M. M., Omotayo, P. (2015). Effects of High Dietary Fat Intake on Biochemical Variables and Pancreas Histoarchitecture in Diabetic Rats. *Journal of Human Nutrition & Food*, 3(1), 1053.
- Avramoglu, R. K., Basciano, H., & Adeli, K. (2006). Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clinica Chimica Acta*, 368(1-2), 1–19.
- Berger, S., Raman, G., Vishwanathan, R., Jacques, P. F., & Johnson, E. J. (2015). Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review. *The American Journal Clinical Nutrition*, 102, 276–294.
- Bhaswant, M., Poudyal, H., & Brown, L. (2015). Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(6), 571–584.
- Boden, G., & Chen, X. (1995). Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(3), 1261–1268.
- Chen, Y., Xu, X., Zhang, Y., Liu, K., Huang, F., Liu, B., & Kou, J. (2016). Diosgenin regulates adipokine expression in perivascular adipose tissue and ameliorates endothelial dysfunction via regulation of AMPK. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 155, 155–165.
- Chirkov YY, Horowitz JD. (2007) Impaired tissue responsiveness to organic

nitrate and nitric oxide: a new therapeutic frontier?. *Pharmacol Ther.*, 116(2), 287-305.

Clarke, R., Frost, C., Collins, R., Appleby, P., & Peto, R. (1997). Dietary lipids and blood cholesterol: quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 314, 112–117.

Danese, E., Montagnana, M., Salvagno, G. L., & Lippi, G. (2017). Can we still trust hemoglobin A 1c in all situations?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 11–12.

Dashwood, M. R., Dooley, A., Shi-Wen, X., Abraham, D. J., & Souza, D. S. R. (2007). Does periadventitial fat-derived nitric oxide play a role in improved saphenous vein graft patency in patients undergoing coronary artery bypass surgery? *Journal of Vascular Research*, 44(3), 175–181.

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., Petersen, K. F., Shulman, G. I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 253–9.

Dudzinski, D., & Michel, T. (2009). Life History of eNOS: Partners and Pathways. *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes*, 162(3), 214–220.

Duvnjak, L., & Duvnjak, M. (2009). The metabolic syndrome - an ongoing story. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60 Suppl 7, 19–24.

Edwards, G., Félétou, M., & Weston, A. H. (2010). Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: A synopsis. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(6), 863-879.

Evans, J. M., Newton, R. W., Ruta, D. a, MacDonald, T. M., & Morris, a D. (2000). Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 17(6), 478–480.

Even, S. E. L., Dulak-Lis, M. G., Touyz, R. M., & Dinh Cat, A. N. (2014). Crosstalk between adipose tissue and blood vessels in cardiometabolic syndrome: Implication of steroid hormone receptors (MR/GR). *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 19(2), 89-101.

Félétou, M., & Vanhoutte, P. M. (2006). Endothelium-derived hyperpolarizing

factor: Where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(6), 1215-1225.

Feng, X., Chen, Y., Zhao, J., Tang, C., Jiang, Z., & Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(1), 153–159.

Floyd, C. N., & Ferro, A. (2014). Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacology and Therapeutics*, 141(1), 69–78.

Funke, A., Schreurs, M., Aparicio-Vergara, M., Sheedfar, F., Gruben, N., Kloosterhuis, N. J. Havinga, R., Houten, S. M., Sverdlov, R. S., Sluis, B. V., Kuivenhoven, J. A., Koonen, D. P., Hofker, M. H. (2014). Cholesterol-induced hepatic inflammation does not contribute to the development of insulin resistance in male LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*, 232(2), 390–396.

Gálvez-Prieto, B., Bolbrinker, J., Stucchi, P., de las Heras, A. I., Merino, B., Arribas, S., Gayo-Ruiz, M., Huber, M., Wehland, M., Kreutz, R., Fernandez-Alfonso, M. S. (2008). Comparative expression analysis of the renin - Angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *Journal of Endocrinology*, 197(1), 55–64.

Gao, Y.-J., Lu, C., Su, L.-Y., Sharma, A. M., & Lee, R. M. K. W. (2007). Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *British Journal of Pharmacology*, 151(3), 323–331.

Gil-Ortega, M., Condezo-Hoyos, L., García-Prieto, C. F., Arribas, S. M., González, M. C., Arangué, I., Gayo-Ruiz, M., Somoza, B., Fernández-Alfonso, M. S. (2014). Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS ONE*, 9(4), 1–10.

Ginsberg, H. N., Karmally, W., Siddiqui, M., Holleran, S., Tall, A. R., Rumsey, S. C., Deckelbaum, R. J., Blamer, W. S., Ramakrishnan, R. (1994). A dose-response study of the effects of dietary cholesterol on fasting and postprandial lipid and lipoprotein metabolism in healthy young men. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology / American Heart Association*, 14(4), 576–586.

Hadi, H. a R., & Suwaidi, J. Al. (2007). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular Health and Risk Management*, 3(6), 853–876.

Hamilton, S. J., & Watts, G. F. (2013). Endothelial dysfunction in diabetes:

Pathogenesis, significance, and treatment. *Review of Diabetic Studies*, 10(2-3), 133–156.

Hirayama, C., Suzuki, H., Ito, M., Okumura, M., & Oda, T. (2003). Propagermanium: a nonspecific immune modulator for chronic. *Journal of Gastroenterology*, 38, 525–532.

Hsueh, W. A., & Quiñones, M. J. (2003). Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *The American Journal of Cardiology*, 92(4), 10–17.

International Diabetes Federation. (2015). *Diabetes. International Diabetes Federation*.

Lastra, G., & Manrique, C. (2015). Perivascular adipose tissue, inflammation and insulin resistance: Link to vascular dysfunction and cardiovascular disease. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 22(1), 19–26.

Leahy, J. L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Archives of Medical Research*, 36(3), 197–209.

Lee, Y., Berglund, E. D., Yu, X., Wang, M.-Y., Evans, M. R., Scherer, P. E., Holland, W. L., Charron, M. J., Roth, M. G., Unger, R. H. (2014). Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(36), 1–7.

Li, X., Everson, W., & Smart, E. J. (2006). and Vascular Pathology eNOS General Mechanistic Overview, 6(1), 1–13.

Liu, C., Wang, Z., Song, Y., Wu, D., Zheng, X., Li, P., Jin, J., Xu, N., Li, L. (2015). Effects of Berberine on Amelioration of Hyperglycemia and Oxidative Stress in High Glucose and High Fat Diet-Induced Diabetic Hamsters In Vivo. *BioMed Research International*, 2015, 1–9.

Lobato, N. S., Filgueira, F. P., Akamine, E. H., Davel, A. P. C., Rossoni, L. V., Tostes, R. C., Carvalho, M. H. C., Fortes, Z. B. (2011). Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: Role of NO and prostanoids. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(10), 808–816.

Lopez, S., Bermudez, B., Pacheco, Y. M., Villar, J., Abia, R., & Muriana, F. J. G. (2008). Distinctive postprandial modulation of {beta} cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), 638–644.

- Lu, J., Varghese, R. T., Zhou, L., Vella, A., & Jensen, M. D. (2017). Glucose tolerance and free fatty acid metabolism in adults with variations in TCF7L2 rs7903146. *Metabolism*, *68*, 55–63.
- McNamara, D. J. (2000). Dietary cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1529*(1-3), 310–320.
- Meyer, M. R., Fredette, N. C., Barton, M., & Prossnitz, E. R. (2013). Regulation of vascular smooth muscle tone by adipose-derived contracting factor. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–10.
- Miao, C., & Li, Z. (2012). The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *British Journal of Pharmacology*, *165*(3), 643–658.
- Mudau, M., Genis, A., Lochner, A., & Strijdom, H. (2012). Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*, *23*(4), 222–231.
- Mulder, P., Hoek, A. M. Van Den, & Kleemann, R. (2017). The CCR2 Inhibitor Propagermanium Attenuates Diet-Induced Insulin Resistance, Adipose Tissue Inflammation and Non- Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS ONE*, *12*(1), 1–14.
- Natali, A., Toschi, E., Baldeweg, S., Ciociaro, D., Favilla, S., Saccà, L., & Ferrannini, E. (2006). Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes*, *55*(4), 1133–1140.
- Olechowski, B., Ashby, A., Mariathas, M., Khanna, V., Mahmoudi, M., & Curzen, N. (2017). Is arachidonic acid stimulation really a test for the response to aspirin? Time to think again? *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, *15*(1), 35–46.
- Padilla, J., Vieira-Potter, V. J., Jia, G., & Sowers, J. R. (2015). Role of Perivascular Adipose Tissue on Vascular Reactive Oxygen Species in Type 2 Diabetes: A Give-and-Take Relationship: Figure 1. *Diabetes*, *64*(6), 1904–1906.
- Paneni, F. (2015). Role of oxidative stress in endothelial insulin resistance. *World Journal of Diabetes*, *6*(2), 326-332.
- Pernow, J., & Jung, C. (2013). Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: Reversal of arginine steal? *Cardiovascular Research*, *98*(3), 334–343.
- Potenza, M. A., Gagliardi, S., Nacci, C., & Carratu, M. R. (2009). Endothelial Dysfunction in Diabetes : From Mechanisms to Therapeutic Targets. *Current Medicinal Chemistry*, *16*, 94–112.

Prospero, N. A. Di, Artis, E., Johnson, D. L., Vaccaro, N., Xi, L., & Rothenberg, P. (2014). CCR2 antagonism in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 1–10.

Qian, J., & Fulton, D. (2013). Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Frontiers in Physiology*, 4 (347), 1–11.

Quon, M. J. (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: Insights from therapeutic interventions. *Journal of Central South University (Medical Sciences)*, 31(3), 305–312.

Rajsheker, S., Manka, D., & Blomkalns, A. (2010). Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. *Current Opinion in*, 10(2), 191–196.

Reaven, G. M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595–1607.

Riccardi, G., Giacco, R., & Rivellese, a a. (2004). Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 23(4), 447–56.

Risérus, U., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2009). Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Progress in Lipid Research*, 48(1), 44–51.

Rivellese, A. A., & Lilli, S. (2003). Quality of dietary fatty acids, insulin sensitivity and type 2 diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomédecine & Pharmacothérapie*, 57(2), 84–7.

Rosales-corrall, S., Tan, D., Manchester, L., & Reiter, R. J. (2015). Diabetes and Alzheimer Disease , Two Overlapping Pathologies with the Same Background : Oxidative Stress, 2015, 1-14.

Sena, C. M., Pereira, A., Fernandes, R., Letra, L., & Seça, R. M. (2017). Adiponectin improves endothelial function in mesenteric arteries of rats fed a high-fat diet: role of perivascular adipose tissue. *British Journal of Pharmacology*, 1-32.

Sena, C. M., Pereira, A. M., & Seça, R. (2013). Endothelial dysfunction - A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2216–2231.

Sena, C. M., Matafome, P., Louro, T., Nunes, E., Fernandes, R., & Seça, R. M. (2011). Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*, 163, 424–437.

Sena, C. M., Proença, T., Nunes, E., Santos, M. S., & Seça, R. M. (2008). The Effect of Soybean Oil on Glycaemic Control in Goto-Kakizaki Rats , an Animal Model

of Type 2 Diabetes. *Medicinal Chemistry*, 4, 293–297.

Simsek, S., Van Den Oever, I. A. M., Raterman, H. G., & Nurmohamed, M. T. (2010). Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation*, 2010, 1-15.

Spijkerman, A. M. W., Dekker, J. M., Nijpels, G., Adriaanse, M. C., Kostense, P. J., Ruwaard, D., Stehouwer, C. D. A., Bouter, L. M. Heine, R. J. (2003). Microvascular complications at time of diagnosis of type 2 diabetes are similar among diabetic patients detected by targeted screening and patients newly diagnosed in general practice: The Hoorn Screening Study. *Diabetes Care*, 26(9), 2604–2608.

Szasz, T., & Webb, R. C. (2014). Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clin Sci (Lond)*, 122(1), 706–721.

Tamura, Y., Sugimoto, M., Murayama, T., Ueda, Y., Kanamori, H., Ono, K., Ariyasu, H., Akamizu, T., Kita, T., Yokode, M., Arai, H. (2008). Inhibition of CCR2 Ameliorates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in db / db Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28, 2195–2201.

Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 456-480.

Unger, R. H. (1995). Lipotoxicity in the Pathogenesis of Obesity-Dependent NIDDM. *Diabetes*, 44, 863–870.

Villacorta, L., & Chang, L. (2015). The role of perivascular adipose tissue in vasoconstriction, arterial stiffness, and aneurysm. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 21(2), 137–147.

Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 94(3), 311–321.

Xia, N., Horke, S., Habermeier, A., Closs, E. I., Reifenberg, G., Gericke, A., Mikhed, Y., Munzel, T., Daiber, A., Forstermann, U. Li, H. (2016). Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(1), 78–85.

Yamashita, T., Kawashima, S., Ozaki, M., Namiki, M., Inoue, N., Hirata, K., & Yokoyama, M. (2002). Propagermanium Reduces Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice via Inhibition of Macrophage Infiltration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(1), 1-8.

Yang, H., Jin, X., Kei Lam, C. W., & Yan, S. (2011). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC*, 49(11), 1773–1782.

Yang, Z., & Ming, X.-F. (2013). Arginase: the emerging therapeutic target for vascular oxidative stress and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 4(149), 1-11.

Yeh-Siang L, Subramaniam G, Hadi AH, Murugan D, Mustafa MR. (2011) Reactive oxygen species-induced impairment of endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings: protection by methanolic extracts of *Phoebe grandis*. *Molecules.*, 16(4), 2990-3000.

Yokochi, S., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Shimokawa, H., Haino, M., Terashima, Y., & Matsushima, K. (2001). An Anti-Inflammatory Drug, Propagermanium, May Target GPI-Anchored Proteins Associated with an MCP-1 Receptor, CCR2. *Journal of interferon and cytokine research*, 21, 389–398.

Zaborska, K. E., Wareing, M., & Austin, C. (2016). Comparisons between perivascular adipose tissue and the endothelium in their modulation of vascular tone. *British Journal of Pharmacology*, 1-23.

Zaborska, K. E., Wareing, M., Edwards, G., & Austin, C. (2016). Loss of anti-contractile effect of perivascular adipose tissue in offspring of obese rats. *International Journal of Obesity*, 40, 1205-1214.