



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



BENEFÍCIOS DO TRATAMENTO COM INSULINA NO DIABETES MELLITUS
TIPO 1 EM ROEDORES – ASSOCIAÇÃO COM A VIA DAS QUINURENINAS

KADMIEL CÂNDIDO

MANAUS – AMAZONAS

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



BENEFÍCIOS DO TRATAMENTO COM INSULINA NO DIABETES MELLITUS
TIPO 1 EM ROEDORES – ASSOCIAÇÃO COM A VIA DAS QUINURENINAS

KADMIEL CÂNDIDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ WILSON DO NASCIMENTO CORRÊA

MANAUS – AMAZONAS

2019

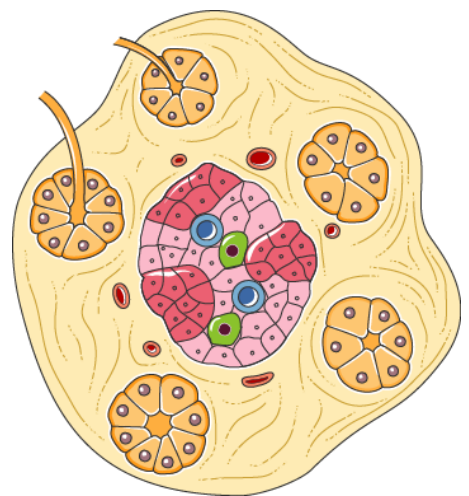
Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C999b Cândia, Kadmiel
Benefícios do tratamento com insulina no diabetes mellitus tipo 1 em roedores - associação com a via das quinureninas / Kadmiel Cândia. 2019
96 f.: il. color; 31 cm.

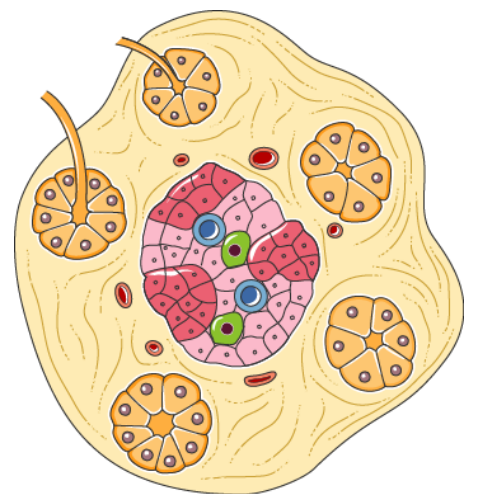
Orientadora: José Wilson do Nascimento Corrêa
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Função vascular. 3. Insulina. 4. Via das quinureninas. I. Corrêa, José Wilson do Nascimento II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



DEDICATÓRIA

*Dedido esse trabalho a realidade substancial que está por traz de todas as coisas a qual eu chamo de **Deus**, a minha falecida mãe-avó **Vanda Cândido de Barros**, que muitas vezes na falta me mostrou o caminho a ser seguido, a ti **mãe** o meu eterno obrigado, e a minha esposa por todo carinho, cuidado, dedicação e compreensão.*



AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Inicialmente, agradeço ao autor e consumidor da minha fé (Deus), pela sabedoria, conhecimento e bênçãos alcançadas. Agradeço por estar presente mesmo sem perceber nos dias de aflições e me ajudar nessa conquista. Tudo que consegui lembro de ter pedido a ti e não teria conquistado sem sua ajuda.

Agradeço também a minha mãe de criação (Vanda Cândido de Barros), pelos momentos que passamos juntos e por todas as vezes que mostrou o caminho a qual deveria ser seguido, como ficaria feliz em ver essa conquista.

A minha mãe biológica Bethânia Cândido de Barros que mesmo longe se fazia perto participando e torcendo por todas minhas conquistas, agradeço a Deus por sua presença. Sei que me deixar com minha avó não foi escolha sua mais um ato de amor e carinho.

Aos meu pai-avô Osmar Cardoso de Barros e meu pai biológico Ulisses da Silva Chagas por todos os conselhos e incentivos ao estudo. Ainda me lembro Pai Ulisses quando me disse que deveria apenas confiar nEle e seguir os seus caminhos. A ambos meus sinceros agradecimentos.

A minha esposa Antônia Camila Monteiro Cândido por me ajudar nessa caminhada e por ter me dado o maior presente de todos, minha filha Caroline Sophia Cândido Monteiro Chagas o motivo da minha alegria diária.

Ao meu tio Wilibran Cândido de Barros por todo carinho e incentivo aos meus estudos e por sempre estar disposto a me ajuda independente de qualquer coisa, nossa mãe ficaria muito orgulhosa por tudo o que tem acontecido em nossa vida, obrigado por tudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa por ter me aberto as portas no ano de 2016 quando o procurei impulsionado e apaixonado por doenças cardiovasculares tenho a certeza que encontrei o melhor! Agradeço por todo conhecimento compartilhado, conversas, correções e ter aberto a minha cabeça para o mundo fascinante da pesquisa, aprendi muito com o senhor.

Aos amigos de laboratório, Nayana Yared Batista (Nay), obrigado por compartilha tudo que sabe, minha dissertação também tem um pedacinho de você. A Ewerton, Sandra e Felipe por me ajudarem na execução do trabalho. A Carol por me ajudar no desenvolvimento do trabalho. Ao Evandro e Zinalton por toda força e incentivo.

Ao professor Oscar Tadeu Ferreira da Costa por todo conhecimento compartilhado e por me ensinar essa técnica tão maravilhosa a estereologia. A sua técnica (Lene), por ter ajudado no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores Pritesch Lalwani, Emerson de Lima, Gemilson Soares, Carlos Cleomir por toda a ajuda concedida. Percebo que nada pode ser feito sozinho e juntos somos mais fortes.

Aos demais professores do programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas – PPGIBA/UFAM, que me ajudaram direta e indiretamente com aulas, dicas sobre o trabalho desenvolvido.

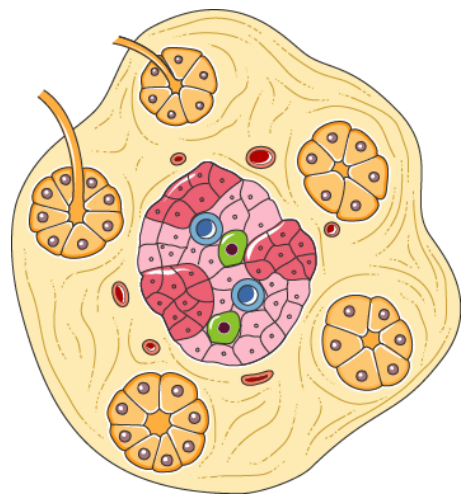
Ao amigo que o PPGIBA me deu Edson Brazão por nunca se negar a ajudar a qualquer assunto relacionado ao programa.

A todos os amigos da turma de imunologia básica e aplicada em especial Diana Mota e Mariana Brasil por toda discussão de artigos que realizamos e conhecimento compartilhado aprendi muito com todos vocês.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem compartilhar e contribuir com o conhecimento de vocês para melhoria do trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas em especial ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – PPGIBA/UFAM pela oportunidade

A Capes pelo suporte financeiro concedido.



RESUMO

RESUMO

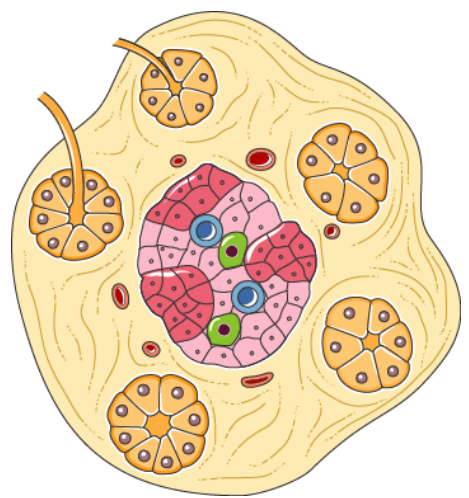
O diabetes *mellitus* é uma doença endócrina e metabólica multifatorial crônica associada a riscos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares como vasculopatia e infarto agudo do miocárdio. O papel de vias metabólicas como a das quinureninas no diabetes mellitus ainda não é bem compreendido, de modo que a investigação dos mecanismos associados à doença e suas repercussões vasculares, objetos deste estudo, podem elucidar novos alvos farmacológicos para o seu tratamento. Este estudo teve como objetivo estabelecer uma relação entre os benefícios do tratamento com insulina em animais diabéticos do tipo 1 e a via das quinureninas. Para os experimentos, ratos Wistar foram divididos três grupos experimentais: Controle (Saudável), diabético (DM) e diabéticos tratados com insulina (DM+INS). Ratos DM receberam tratamento com insulina por 14 dias (10 UI/Kg, 2x/dia, IP). Constatou-se que o tratamento com insulina de ratos DM foi capaz de aumentar a atividade da indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO1) em comparação a ratos DM e controle. Estes achados foram concomitantes à observação de significativa resposta vasodilatadora no grupo DM+INS em relação a ratos DM, tanto em aorta como na vasa vasorum periaórtica, cujo volume luminal encontrava-se reduzido em ratos DM. Observou-se atrofia da camada média da vasa vasorum em ratos DM, a qual foi revertida com o tratamento de ratos DM com insulina. A espessura da camada média aórtica foi semelhante entre os grupos. Adicionalmente, a avaliação estereológica demonstrou redução do volume do tecido adiposo perivascular em ratos DM, a qual foi revertida com o tratamento com insulina. Também observamos um aumento da excreção de proteína e creatinina urinária com respectiva redução em seus níveis plasmáticos em ratos DM, o que pode ser ocasionado pela supra elevação fisiológica do fluxo urinário, característica inicial da nefropatia diabética. Em conjunto, os dados revelam 14 dias pós-indução do diabetes do tipo 1 foram capazes de modificar a rota metabólica das quinureninas e a função vascular, mais não foram suficientes para gerar lesão renal grave. Até o momento do término deste trabalho não identificamos na literatura trabalhos que associem o tratamento com insulina, a rota metabólica das quinureninas e suas associações sobre os efeitos vasculares no diabetes do tipo 1. Apesar destes resultados iniciais não permitirem o estabelecimento definitivo de uma relação causa-efeito, a observação de que o tratamento padrão para DM1 com insulina foi capaz de reverter alterações estruturais sobre o PVAT e camada média da vasa vasorum periaórtica, corrigir a excreção de proteínas, além de promover restauração do tônus vascular de maneira concomitante ao aumento da atividade IDO1 e, portanto, com maior produção de KYN, sugerem um possível papel regulatório dos produtos desta via sobre as alterações vasculares e renais associadas ao diabetes tipo 1. Uma investigação mais minuciosa da via neste cenário poderá elucidar novos alvos terapêuticos para o tratamento das complicações vasculares e renais desta patologia.

Palavras-Chave – Diabetes *mellitus* tipo 1; função vascular; insulina; via das quinureninas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic multifactorial endocrine and metabolic disease associated with risks in the development of cardiovascular diseases such as vasculopathy and acute myocardial infarction. The role of the quinurenin metabolic pathways in diabetes mellitus is not yet well understood, so the investigation of the mechanisms associated with the disease and its vascular repercussions, objects of this study, might elucidate new pharmacological targets for its treatment. This study aimed to establish a relationship between the benefits of insulin treatment in type 1 diabetic animals and the quinurenin pathway. For the experiments, Wistar rats were divided into three experimental groups: Control (Healthy), Diabetic (DM) and Diabetes treated with insulin (DM + INS). DM rats received insulin treatment for 14 days (10 IU / kg, 2x / day, IP). Insulin treatment of DM rats was found to increase the activity of indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO1) compared to DM and control rats. These findings were concomitant with the observation of a significant vasodilator response in the DM + INS group in relation to DM rats, both in the aorta and periaortic vasa vasorum, whose luminal volume was reduced in DM rats. Atrophy of the middle layer of vasa vasorum was observed in DM rats, which was reversed by treating DM rats with insulin. The thickness of the aortic middle layer was similar between groups. Additionally, the stereological evaluation demonstrated a reduction in perivascular adipose tissue volume in DM rats, which was reversed with insulin treatment. We also observed an increase in urinary protein and creatinine excretion with a respective reduction in their plasma levels in DM rats, which may be caused by a physiological upregulation of the urinary flow, an initial characteristic of diabetic nephropathy. Taken together, the data reveal that 14 days after induction of type 1 diabetes in Wistar rats were able to inhibit the metabolic route of quinurenins and compromise vascular function, but were not sufficient to generate severe renal injury. Until the end of this study, we have not identified in the literature studies that correlates insulin treatment, the metabolic route of quinurenins and their association on vascular effects in type 1 diabetes. Although these initial results do not allow the definitive establishment of a causal relationship, we were able to observe that the standard treatment for DM1 with insulin was able to reverse structural changes on PVAT and middle layer of the periaortic vasa vasorum, correct protein excretion, and promote restoration of vascular tone concurrently with increased IDO1 activity and, therefore, with higher KYN production, suggesting a possible regulatory role of this pathway products on vascular and renal changes associated with type 1 diabetes. Further investigation of the pathway in this setting may elucidate new therapeutic targets for the treatment of these diseases, specially its vascular and renal complications.

Key Words – type 1 diabetes; vascular function; insulin; quinurenin pathway.



LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-MT	1-metil triptofano
3-HK	3-hidroxiquinurenina
AVE	Acidente vascular encefálico
AA	Ácido antranílico
ADA	Associação americana do diabetes
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Células dendríticas
CA²⁺	Cálcio
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DCs	Células dendríticas
DM	Diabetes mellitus
DU	Dose única
DCVs	Doenças cardiovasculares
DRC	Doença renal crônica
DAC	Doenças da artéria coronariana
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EDCF	Fator constritor derivado do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
e-NOS	Óxido nítrico síntese endotelial
GCK	Glucoquinase
GLP - 1	Peptídeo 1 do tipo glucagon
GTP	Guanosina trifosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HbA1C	Hemoglobina glicada
IDF	Federação Internacional de diabetes
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase

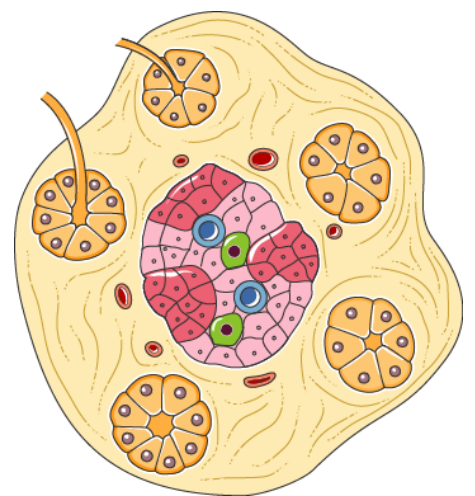
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
KYN	Quinurenina
KA	Ácido quinurênico
MLV	Músculo liso vascular
MMP	Metaloproteinases de matriz
MEC	Matrix extracelular
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NA	Sódio
n-NOS	Óxido nítrico sintase neural
OMS	Organização mundial da saúde
PVAT	Tecido adiposo perivascular
PKA	Proteína quinase
PKG	Proteína quinase G
QA	Ácido quinolínico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RFG	Ritmo de filtração glomerular
SNP	Polimorfismos de bases únicas
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TNF - α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF - β	Fator de crescimento transformante beta
TDO	Triptofano 2,3 dioxigenase
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
TRP	Triptofano
UI	Unidades internacionais
VCAM	Moléculas de adesão do endotélio vascular
XA	Ácido xanturênico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Epidemiologia mundial do diabetes.....	24
Figura 2: Sinalização da secreção de insulina.....	26
Figura 3: Esquema representativo das enzimas óxido nítrico sintase.....	31
Figura 4: Mecanismo simplificado da vasodilatação endotélio dependente.....	32
Figura 5: Esquema representativo da via das quinureninas.....	37
Figura 6: Grupos experimentais.....	43
Figura 7: Indução do diabetes.....	43
Figura 8: Balança de precisão, gaiola metabólica e centrífuga.....	45
Figura 9: Cromatogramas quinurenina e triptofano.....	47
Figura 10: Grid de contagem de pontos para o Cavalieri e Delesse.....	50
Figura 11: Padronização da indução do diabetes mellitus.....	53
Figura 12: Teste de tolerância a insulina.....	54
Figura 13: Análise do peso corporal.....	55
Figura 14: Determinação dos níveis de quinurenina e triptofano.....	58
Figura 15: Determinação do volume de Cavalieri.....	59
Figura 16: Determinação do volume relativo de Delesse.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Testes e valores diagnósticos para o diabetes.....	29
Tabela 2: Fluxo urinário, consumo de água e ração.....	56
Tabela 3: Parâmetros bioquímicos e marcadores da função renal.....	57

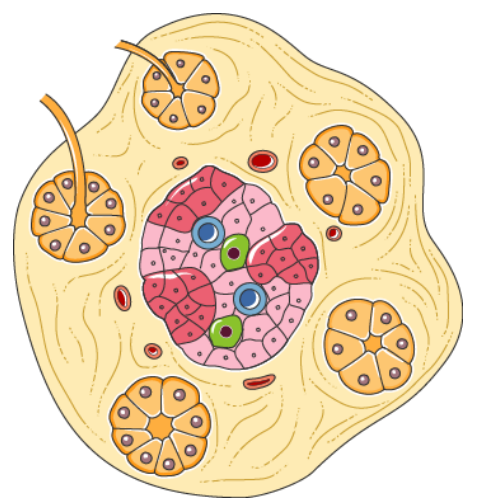


SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS	24
2.2 REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA E TIPOS DE DIABETES MELLITUS	26
2.3 DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS.....	28
2.7 DIABETES MELLITUS E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES.....	34
2.8 VIA DAS QUINURENINAS.....	36
2.9 VIA DA QUINURENINA E DIABETES MELLITUS.....	38
3. OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS.....	43
4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA.....	44
4.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS.....	44
4.3.1 PESO CORPORAL.....	44
4.3.2 GAIOLA METABÓLICA.....	44
4.3.3 CONSUMO DE ÁGUA, RAÇÃO E FLUXO URINÁRIO.....	44
4.4 COLETA DE SANGUE.....	45
4.4.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA E MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL.....	45
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	47
4.5.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO E DAS AMOSTRAS.....	48
4.6 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS VASCULARES.....	48
4.6.1 PERFUSÃO, DESIDRATAÇÃO, CORTE E COLORAÇÃO.....	48
4.6.2 ESTEREOLOGIA COMO AVALIAÇÃO FUNCIONAL VASCULAR.....	49
4.6.3 DETERMINAÇÃO DO VOLUME RELATIVO DE DELESSE.....	50
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
5 RESULTADOS	53
5.1 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS E TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA....	53
5.2 ANÁLISE DO PESO CORPORAL, METABOLISMO E INSULINOTERAPIA.....	54
5.3 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA, URINÁRIA E AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL.....	56
5.4 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE QUINURENINA E TRIPTOFANO PLASMÁTICAS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA IDO.....	57
5.5 ESTEREOLOGIA VASCULAR.....	58
5.5.1 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE CAVALIERI.....	58
5.5.2 DETERMINAÇÃO DO VOLUME RELATIVO DE DELESSE.....	60

6. DISCUSSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES.....	81



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As quinureninas (KYN) são pequenas biomoléculas com funções diversificadas derivadas do aminoácido essencial triptofano (TRP). São sintetizadas quando o TRP é metabolizado pela via das quinureninas através de enzimas catabólicas. Os metabólitos do triptofano influenciam em uma gama de funções fisiológicas orgânicas e sua expressão está usualmente elevada em condições patológicas como no diabetes mellitus (DM) e doenças cardiovasculares (DCVs) (KOLODZIEJ; PALEOLOG; WILLIAMS, 2011; OXENKRUG, 2015; SONG et al., 2017).

Recentemente, estudos sobre a via das quinureninas (KYN) tem chamado a atenção de pesquisadores não apenas por regular algumas funções fisiológicas como a imunidade, mas também por estarem particularmente envolvidas em processos patológicos (OXENKRUG, 2015; SONG et al., 2017; CHAVES FILHO et al., 2018). Observou-se que os metabólitos da via influenciam em uma gama de funções fisiológicas orgânicas e seus níveis estão particularmente desregulados na vigência de doenças cardiovasculares (DCVs) e metabólicas como o diabetes mellitus (DM) (KOLODZIEJ; PALEOLOG; WILLIAMS, 2011; OXENKRUG, 2015; SONG et al., 2017).

O diabetes mellitus é uma doença crônica, multifatorial, endócrina e metabólica que está em curso epidêmico na atualidade. Não é considerada uma doença única, mas sim um grupo de doenças heterogêneas caracterizadas por estado hiperglicêmico decorrente de resistência insulínica, da secreção de insulina ou ambas (LYRA et al., 2016).

Segundo dados da federação internacional de diabetes (IDF), atualmente existem cerca de 425 milhões de pessoas em todo mundo com a doença e a projeção é de alarmantes 629 milhões de casos em 2045, sendo o grupo etário jovem o mais acometido. Aproximadamente 80% dos indivíduos com diagnóstico de DM vivem em países em desenvolvimento como o Brasil. Fatores genéticos, alimentares, bem como o sedentarismo são primordiais para o aumento do número de casos (IDF, 2017).

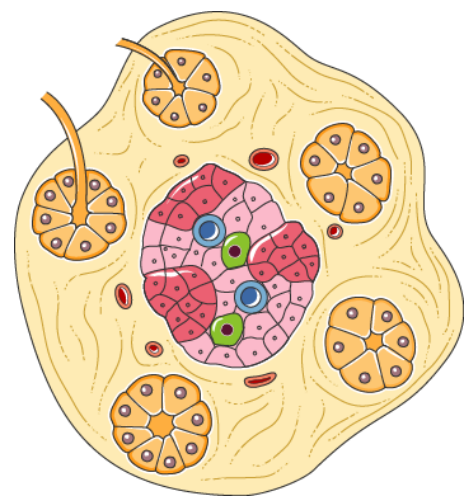
Diversas pesquisas têm demonstrados que o estado hiperglicêmico característico do DM leva a disfunções do endotélio vascular através de efeitos lesivos diretos sobre a parede arterial. Distúrbios vasculares como a doença cardíaca isquêmica, acidente vascular encefálico, nefropatia, entre outros, são bastantes comuns em portadores de DM e produzem elevados índices de morbimortalidade (BILKAN, 2017; WILD, 2004).

A desregulação da via das quinureninas está diretamente relacionada ao aumento das respostas inflamatórias em diversos tecidos, incluindo o endotélio vascular e o músculo

cardíaco. Assim sendo, acredita-se que em indivíduos portadores de DM elas possam efetivamente participar de mecanismos compensatórios associados ao desenvolvimento das complicações vasculares (MALLMAN, 2014; DIAS, 2015).

Dados da literatura reportam desregulação dos níveis plasmáticos de metabólitos da via das quinureninas em doenças cardiovasculares, especialmente em qualquer forma clínica de DM. Por outro lado, os impactos desta desregulação da via sobre o órgão alvo ainda não são bem compreendidos. Mesmo com os avanços nos estudos sobre marcadores precoces de doenças cardiovasculares, as estimativas de risco cardiovascular em pacientes diabéticos, bem como avaliação da vasculopatia comumente presente nestes ainda carece de instrumentos mais precisos e fidedignos (OXENKRUG; DER HART; SUMMERGRAD, 2015; OXENKRUG, 2015). Desta forma, avaliar os níveis plasmáticos das quinureninas e compreender sua participação na modulação dos efeitos deletérios teciduais associados ao DM podem vir a favorecer a identificação de um novo biomarcador de prognóstico da doença, além de elucidar novos alvos terapêuticos para o seu tratamento.

Portanto, este estudo pretende colaborar com o estabelecimento da relação entre os efeitos vasculares e renais associados ao DM1 em ratos Wistar, seu tratamento e a participação da via das KYN, visando elucidar novas estratégias farmacológicas ou de diagnóstico para manejo clínico de pacientes diabéticos.



REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus é uma doença crônica, multifatorial, endócrina e metabólica que está em curso epidêmico na atualidade. É caracterizado por um estado hiperglicêmico resultante de defeitos na ação da insulina, de sua secreção ou ambos (LYRA et al., 2016). Levantamento epidemiológico realizado pela International Diabetes Federation (IDF) no ano de 2017 verificou que existem atualmente cerca de 425 milhões de pessoas com a doença em todo mundo. A projeção é de alarmantes 629 milhões de casos em 2045, atingindo principalmente a população jovem.

Em relação à faixa etária, há 123 milhões de pessoas diagnosticadas com DM acima de 65 anos de idade, 327 milhões entre 20 e 64 anos, além de 352 milhões de pessoas com intolerância à glicose, condição que representa risco de desenvolvimento da doença (IDF, 2017). O DM é considerado como a décima primeira causa comum de incapacidade em todo mundo, propiciando a gênese de doenças renais, vasculares, oculares, além de agravar doenças infecciosas e parasitárias como a tuberculose, HIV, malária e dengue (YACCOB et al., 2014; LYRA et al, 2016; IDF, 2017).

Conforme a Federação Internacional do Diabetes, no ano de 2017, a prevalência na América do Sul de DM foi de 26 milhões de pessoas, com uma projeção de 42 milhões de pessoas para o ano de 2045. Esse incremento alarmante de 62% no número de casos da doença vem causando grande preocupação aos órgãos de saúde mundial (figura 1 A e B) (IDF, 2017).



Figura 1 A – Distribuição do diabetes mellitus por idade (adaptado de: IDF, 2017).

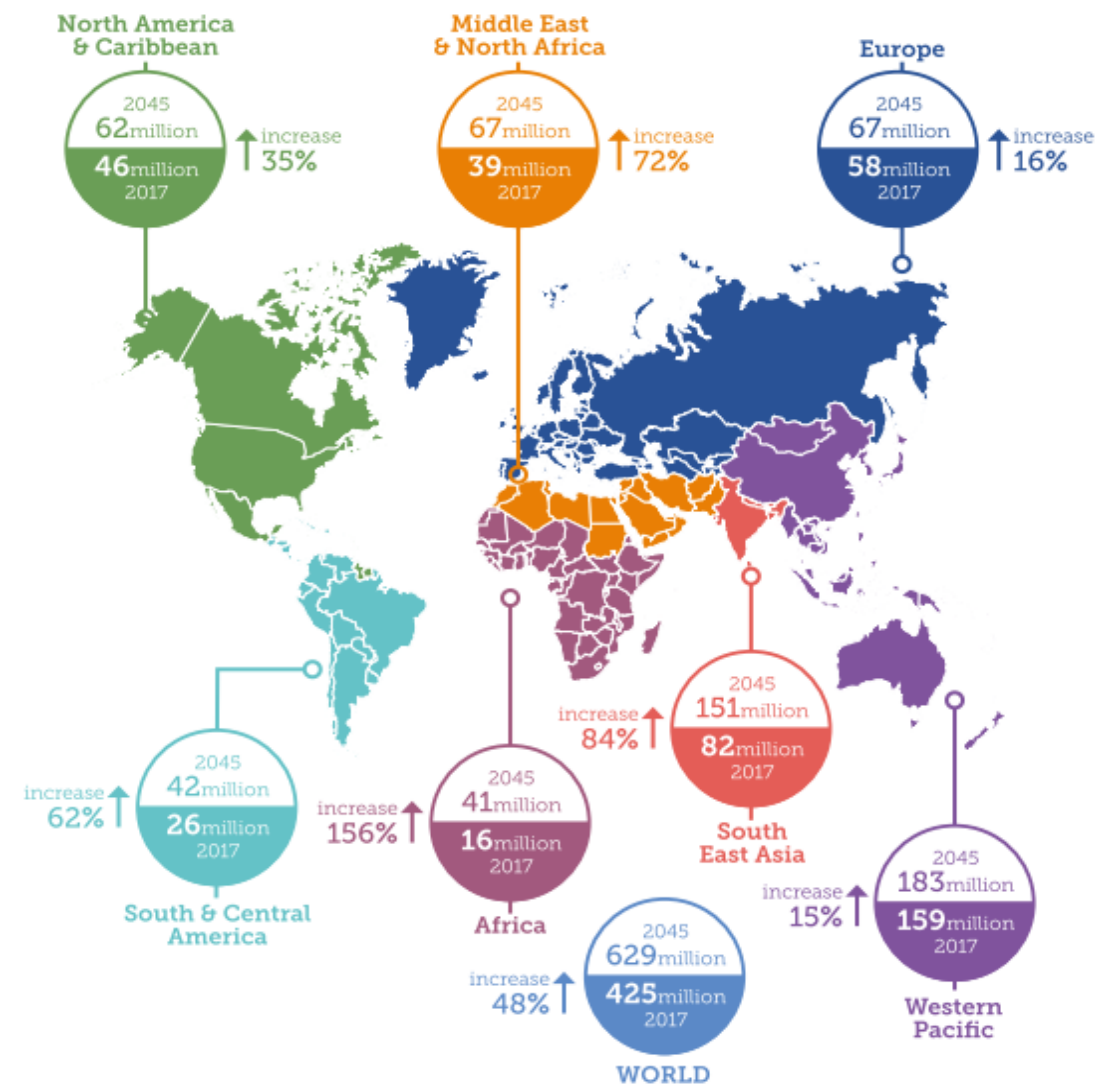


Figura 1B – Número de pessoas com diabetes por região ao redor do mundo em 2017 e 2045 (20-70 anos de idade) e distribuição do diabetes mellitus por idade (adaptado de: IDF, 2017).

No Brasil, no ano de 2016, segundo dados do ministério da saúde por meio do serviço de vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas realizadas por inquérito telefônico (VIGITEL), a incidência de diabetes mellitus teve um aumento de 61,8%, passando de 5,5% em 2006 para 8,9% em 2016 (VIGITEL, 2016).

Essa pandemia emergente é impulsionada pelo aumento do envelhecimento populacional, falta de atividade física e níveis crescentes de pessoas com obesidade, esta última sendo considerada a principal causa (VAN DIEREN et al., 2010).

2.2 REGULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA E TIPOS DE DIABETES MELLITUS

O pâncreas é um órgão com dupla função orgânica, sendo responsável tanto por funções metabólicas/digestivas quanto hormonais. É formado por células secretoras de diversos hormônios como a insulina e o glucagon, essenciais na regulação do metabolismo da glicose. As células β -pancreáticas localizadas nas ilhotas de Langerhans são responsáveis pela liberação de insulina e o comprometimento dessas células é característica marcante do diabetes (KEANE; NEWSHOLME, 2014). As células β pancreáticas monitoram e reagem à elevação na concentração de glicose sanguínea, aminoácidos e outros hormônios e mediadores autonômicos com a liberação de insulina, sendo a glicose o estímulo mais comum.

A sinalização da liberação de insulina pelo pâncreas se inicia com a captação da glicose por transportadores (Glut1) nas células β . A glicose captada é fosforilada pela glucoquinase (GCK) que atua como um sensor de glicose. Os produtos do metabolismo da glicose entram na cadeia respiratória e formam o trifosfato de adenosina (ATP). O aumento dos níveis de ATP causa um bloqueio nos canais de potássio (K^+) sensíveis ao ATP, levando à despolarização da membrana e ao influxo de cálcio (Ca^{2+}) via canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Este aumento das concentrações citoplasmáticas de cálcio causa exocitose pulsátil dos grânulos de insulina (ASHCROFT; RORSMAN, 2012; KEANE; NEWSHOLME, 2014).

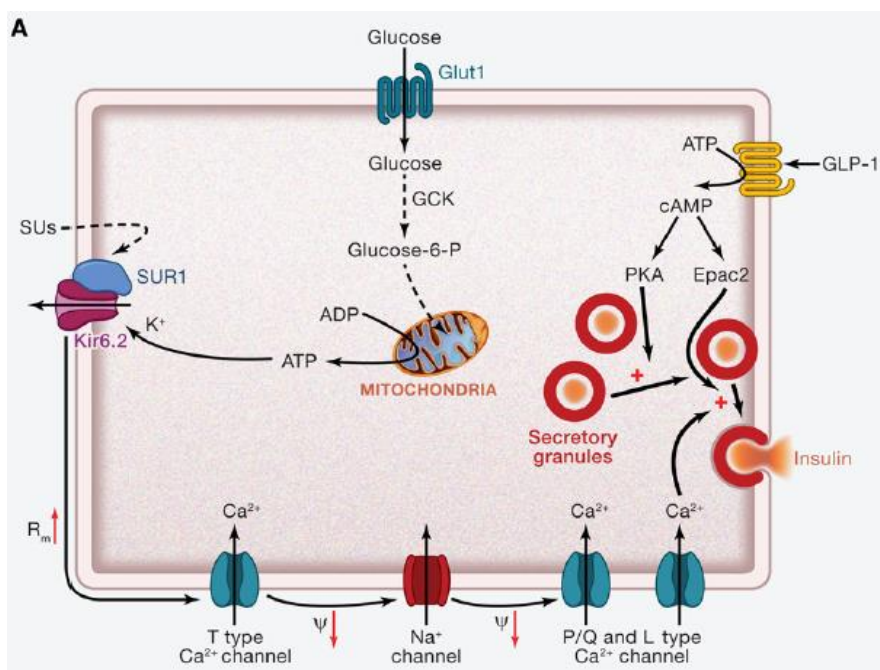


Figura 2 – Metabolismo da glicose e sinalização para secreção de insulina pelas células β pancreáticas em humanos. (Adaptado de: ASHCROFT, 2014).

Incretinas como peptídeo 1 do tipo glucagon (GLP-1), liberadas pelo intestino potencializam a exocitose por mecanismos dependentes de proteína quinase (PKA), e dependente de Epac2 frente ao aumento das concentrações de glicose intestinais. O peptídeo estimula a produção pelas células beta de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), intracelular, que age por mecanismos dependentes da PKA e independentes da PKA para amplificar a exocitose granular, além de melhorar o fechamento do canal K_{ATP} , a atividade elétrica das células beta e a liberação de cálcio das reservas intracelulares (LEECH et al, 2011) (Figura 2). Em situações de hipoglicemia, os canais para potássio se mantem abertos, produzindo hiperpolarização da membrana, impedindo a abertura dos canais de Ca^{2+} e a secreção de insulina (ASHCROFT; RORMAN, 2012).

A classificação atual do DM, de acordo com a American Diabetes Association (ADA), se baseia na etiologia da doença e não conforme o tipo de tratamento. Desta forma, distingue-se quatro categorias de diabetes mellitus manifestado na clínica: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos (DM tipo MODY, neonatal, mitocondrial, entre outros) (ADA, 2014). O estado hiperglicêmico característico que ocorre em pacientes com DM 1 é resultado da deficiência da produção de insulina pelas células β -pancreáticas devido à destruição causada por células do sistema imunológico, normalmente produto da presença de auto anticorpos contra as ilhotas pancreáticas. Tal manifestação ocorre usualmente na infância, sendo responsável por 5 a 10% dos quadros de diabetes. (ASHCROFT; RORSMAN, 2012; HOOGWERF; SFERRA; DONLEY, 2006).

O DM2 tem como característica o quadro hiperglicêmico resultante da diminuição na produção de insulina ou resistência pelas células orgânicas à sua ação, sendo este o tipo de diabetes mais incidente na atualidade. Múltiplos são os fatores de riscos associados à sua manifestação, sendo o principal deles a obesidade (ASHCROFT; RORSMAN, 2012; HOOGWERF; SFERRA; DONLEY, 2006). O DM2 está presente em 90 a 95% dos casos de diabetes diagnosticados e podem ser considerados uma pandemia emergente, impulsionada pelo envelhecimento populacional, falta de atividade física e níveis crescentes de pessoas com obesidade (VAN DIEREN et al., 2010).

O diabetes gestacional é definido como um grau variável de intolerância à glicose e resistência a ação da insulina que ocorre em 5 a 20 % das gestantes. Detectado geralmente entre o segundo e terceiro trimestre de gestação, ocorre devido à ação diabotogênica de hormônios comuns a gestação como a progesterona, prolactina e hormônio lactogênico placentário,

representando risco aumentado de morbidade pré-natal e desenvolvimento de DM 2 futuro (AL-BADRI; ZANTOUT; AZAR, 2015; ALBERTO MAGANHA et al., 2003).

Dentro da categoria de diabetes de outros tipos específicos cabe salientar o diabetes tipo MODY, que corresponde a 1 a 2% dos tipos de diabetes. É secundário a mutações gênicas na função das células β pancreáticas e de ocorrência em adultos jovens. O diagnóstico precoce é altamente relevante para uma boa conduta intervencionista e minimização da progressão da doença, porém o valor financeiro elevado do diagnóstico genético e desconhecimento sobre métodos diagnóstico podem comprometer a conduta a terapêutica e favorecer a lesão de órgãos alvo (HENRIQUES et al., 2018).

Os sinais e sintomas clássicos do diabetes são poliúria, polidipsia e polifagia e ocorrem frequentemente com maior intensidade no DM1, com rápido desenvolvimento de hiperglicemia grave. A perda de peso é comum no DM1 e quase indetectável no DM2. Outras manifestações clínicas da doença comum são irritabilidade, fadiga, infecções de repetição, acantose nigricans, perda da visão e disfunção erétil (RAMACHANDRAN'S, 2014).

Os fatores que podem desencadear diabetes mellitus são diversos, desde causas genéticas a fatores ambientais, levando a complicações micro e macro vasculares. Entretanto, todos os tipos de diabetes apresentam algo em comum, a lesão vascular e endotelial, as quais acarretam em prejuízos tanto na função cardíaca como vascular (WAJCHENBERG et al., 2008).

Além dos fatores genéticos associados ao risco de desenvolvimento do diabetes, os fatores condicionantes ambientais como estresse, sedentarismo, maus hábitos alimentares, dislipidemias, hipertensão arterial sistêmica (HAS), idade, sobrepeso e a obesidade são considerados fatores de riscos para o desenvolvimento da doença (PEREIRA, 2011; RAMACHANDRAN'S, 2014; PATRÍCIO et al., 2016).

2.3 DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS

O diagnóstico do DM acaba tornando-se difícil devido ao sinais e sintomas clássicos da doença não estarem presentes na maioria dos casos, sendo necessários exames laboratoriais para a confirmação da doença como o teste oral de tolerância a glicose (TOTG), glicose plasmática em jejum, glicemia casual ou hemoglobina glicada (HbA1C) (SBD, 2016; ADA, 2015).

Conforme a Sociedade Brasileira do Diabetes (SBD), a glicemia em jejum deve variar entre 100 e 125 mg/dl, porém esse critério ainda não foi estabelecido pela Organização Mundial

da Saúde. Protocolos internacionais como o da Federação Internacional do Diabetes estabelecem um ponto de corte de 100 mg/dl (SBD, 2016).

A tolerância a glicose diminuída ocorre quando, após uma sobrecarga de 75 gramas de glicose por via oral, o valor da glicemia em 2 horas se mantém entre 140 a 199 mg/dl. Estes achados determinam risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus (SBD, 2016; ADA, 2015).

Em 2009 foi proposto pelo comitê de diagnóstico e prevenção do diabetes o uso da hemoglobina glicada (HbA1c) como critério de diagnóstico para o DM. O comitê alega que a HbA1c avalia o grau da exposição aos níveis elevados de glicose durante longos períodos de tempo e que esses valores se mantêm estáveis após a coleta do sangue para análise. Este exame baseia-se na identificação da quantidade de hemoglobina que sofreu glicação na corrente sanguínea e auxilia no diagnóstico e controle da doença a longo prazo ao estabelecer uma média da glicemia nos últimos três meses. Cumpre ressaltar que os valores de HbA1c podem ser modificados por algumas doenças hematológicas como a hemofilia e anemia falciforme (SBD, 2016; ADA, 2015).

Conforme dados da American Diabetes Association (ADA) e a SBD, os critérios para confirmação diagnóstica englobam os quadros de pré-diabetes e diabetes (Tabela 1).

Tabela 1 - Teste e valores diagnósticos para diabetes.

	Pré-diabetes	Diabetes
HbA1C	5,7% a 6,4%	>6,5%
Glicose em Jejum	100 a 125 mg/dl	≥ 126 mg/dl
TOTG	140 a 199 mg/dl	≥ 200mg/dl
Glicemia casual	-----	≥ 200mg/dl + sinais clássicos

Fonte: ADA e SBD, 2016.

As complicações do DM podem acontecer em qualquer uma de suas formas clínicas, levando ao comprometimento de órgãos alvo como o coração e vasos sanguíneos, acarretando em insuficiência cardíaca, doenças vasculares periféricas, cegueira, doença renal crônica e amputações não traumáticas (CLELAND, 2012; HOOGWERF; SFERRA; DONLEY, 2006).

2.4 ENDOTÉLIO VASCULAR

O endotélio vascular representa uma monocamada de células que revestem o interior dos vasos sanguíneos como artérias, veias e o interior das câmaras cardíacas, fazendo uma interface entre o sangue e o músculo liso vascular (MLV) (STORCH et al., 2017). O endotélio exerce diversas funções fisiológicas orgânicas como angiogênese, coagulação sanguínea, adesão/rolagem e migração de leucócitos, além da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras, fatores estes que contribuem para a homeostase da função vascular (VANHOUTTE, 2009; STORCH et al., 2017).

As células endoteliais são capazes de sintetizar e liberar diversas substâncias que influenciam a reatividade e o tônus vasomotor. Essas substâncias com funções modulatória sobre o tônus e MLV foram denominadas de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) como o óxido nítrico (NO), prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio regulando assim o tônus vascular (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1989; VANHOUTTE, 2009; ANGELI, 2013).

Substâncias vasoconstritoras como a angiotensina II e endotelina também modulam a resposta vascular e foram denominadas de fatores de contração derivados do endotélio (EDCF). O desequilíbrio entre a liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores, juntamente com o estresse oxidativo está associada a patologias que acometem o sistema cardiovascular como o diabetes mellitus, reduzindo moléculas com funções relaxantes sobre o vaso e potencializando a resposta contrátil (FURCHGOTT & ZAWADSKI, 1989; VANHOUTTE, 2009; ANGELI, 2013).

Dentre as substâncias modulatória do tônus vascular, o óxido nítrico figura como o principal produto com função vasodilatadora, especialmente em vasos de grande calibre, e sua síntese e ação merecem destaque (VANHOUTTE et al., 2017).

2.5 ÓXIDO NÍTRICO E VASODILATAÇÃO ENDOTÉLIO DEPENDENTE

O NO é uma substância gasosa, incolor, alta capacidade de permeabilidade sobre as membranas celulares e meia vida plasmática bastante reduzida, com diversas funções biológicas descritas na literatura, sobretudo na biologia vascular (KERWIN; LANCASTER; FELDMAN, 1995).

A síntese e produção de NO se dá a partir da conversão do aminoácido L – arginina em L – citrulina pela ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Esta enzima apresenta três isoformas (Figura 3), sendo duas constitutivas (C-NOS) e dependentes do complexo cálcio

calmodulina para sua ativação, e uma induzível (i-NOS), produzida pela liberação de citocinas por células inflamatórias como os macrófagos e outras células ativadas e ativação independente de cálcio (MARLETTA, 1994; VANHOUTTE et al., 2017).

As isoformas constitutivas das enzimas NOS compreendem a óxido nítrico sintase neuronal (n-NOS), presentes habitualmente nos neurônios e a óxido nítrico sintase endotelial (e-NOS), presente nas células endoteliais vasculares importante na síntese de NO a partir do aminoácido L-arginina (VANHOUTTE et al., 2017).

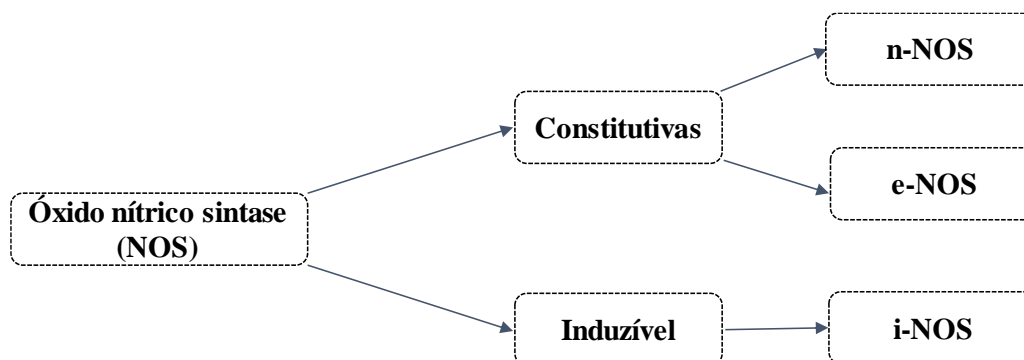


Figura 3 – Esquema representativo das isoformas constitutivas e induzível das enzimas óxido nítrico sintase.

O NO formado pela ação da enzima e-NOS difunde-se para as células do músculo liso vascular acarretando em uma alteração conformacional na enzima guanilato ciclase solúvel, deixando-a ativa. A guanilato ciclase ativada transforma a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), acarretando no fechamento dos canais de cálcio e diminuição de cálcio intracitoplasmático, bem como inibição da liberação de cálcio do retículo endoplasmático e aumento da recaptação de cálcio para o retículo sarcoplasmático causando vasodilatação (BECKMAN & KOPENOLL, 1996; GEWALTIG & KOJDA, 2002).

Em condições normais, os mecanismos de vasodilatação vascular ocorrem quando a tensão de cisalhamento em resposta ao aumento do fluxo sanguíneo, favorece o aumento intracelular de Ca^{2+} por estimular canais de Ca^{2+} sensíveis ao estiramento, permitindo seu influxo, formação do complexo cálcio-calmodulina e ativação a e-NOS nas células endoteliais. A acetilcolina ganhou notoriedade pelo seu mecanismo de vasodilatação ser dependente de um endotélio intacto através da ligação de receptores muscarínicos do tipo 3 acoplados a proteína Gq na membrana das células endoteliais, levando a ativação (fosforilação), da e-NOS ancorada nas células endoteliais e consequente produção de NO o que permitiu sua utilização experimental

em vasos sanguíneos isolados para avaliar a função endotelial (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; VANHOUTTE et al., 2017).

Outro fator vasodilatador liberado pelas células endoteliais é o EDHF que exerce seus efeitos mediado pela ativação de canais de K^+ na musculatura lisa vascular que hiperpolariza a membrana e diminui a concentração de Ca^{2+} no interior da célula muscular lisa, levando a vasodilatação (VANHOUTTE, 1999).

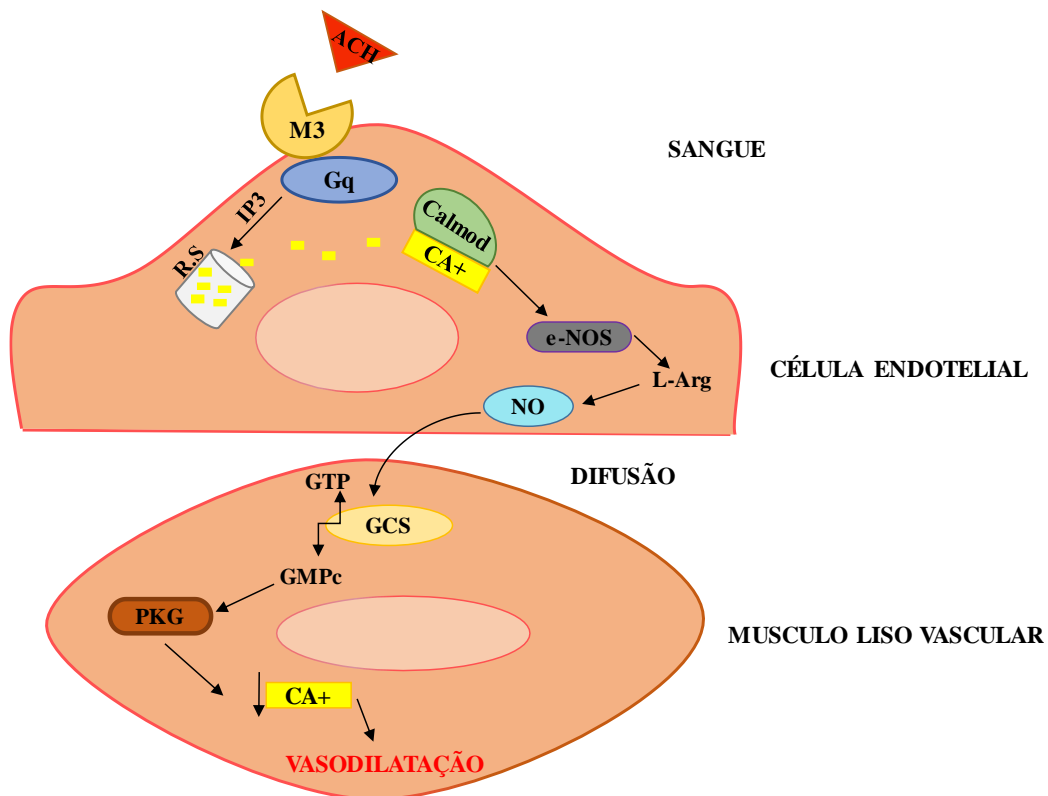


Figura 4 – Mecanismo simplificado da vasodilatação endotélio dependente (CANDIDO, 2019).

2.6 TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR E INFLUÊNCIAS SOBRE A FUNÇÃO VASCULAR

O tecido adiposo perivascular (PVAT) é definido como o tecido que circunda os vasos sanguíneos sem separação da camada adventícia, com funções endócrinas e moduladoras sobre a função vascular (ERINGA et al, 2012).

Muito embora o PVAT seja abundante nas proximidades da vasculatura dos animais e humanos, sua função modulatória sobre a resposta vascular foi ignorada durante muito tempo pelos pesquisadores, que sempre o dissecavam das proximidades dos vasos sanguíneos e linfáticos por acharem que não exercia nenhuma função (POND, 2017).

Devido a isso, haviam poucas pesquisas que relacionavam o PVAT com a função vascular, até que em 1991 dois pesquisadores comprovaram que o PVAT participa diretamente na responsividade do músculo liso vascular (MLV). Observou-se que vasos intactos quando comparados aos vasos sem PVAT apresentavam sensibilidade diminuída a norepinefrina em artérias isoladas de ratos, iniciando-se a partir daí o interesse na investigação das funções modulatória desse tecido (SOLTIS & CASSIS, 1991). Apenas em 2001 Okamoto e Cols. relatam que a invasão de células inflamatórias no PVAT poderia estar associada a um desenvolvimento maior de doenças cardiovasculares (DCVs) (OKAMOTO et al, 2001).

Em condições fisiológicas, o PVAT diminui a vasoconstrição induzidas por substâncias contráteis como a fenilefrina e norepinefrina, sendo assim denominada como ação anti-contrátil do PVAT. O PVAT é responsável também por aumentar a vasodilatação induzida por substâncias vasodilatadoras como a acetilcolina em artérias mesentéricas, de modo a contribuir para o funcionamento vascular adequado às condições fisiológicas (WANG et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2013).

Em condições patológicas como na obesidade e DM, a migração de leucócitos como macrófagos e células dendríticas para o PVAT, exacerbam a liberação de citocinas inflamatórias como a IL-6 e fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Nestas condições ocorre comprometimento da atividade anti-contrátil e vasodilatadora do PVAT, o que gera prejuízos à mecânica vascular (WANG et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2013; QIU et al., 2018).

A maneira pelo qual essas citocinas inflamatórias levam a disfunção cardíaca e vascular envolve danos diretos ao endotélio vascular e estímulo ao estresse oxidativo, este último diminuindo a biodisponibilidade de fatores vasodilatadores do músculo liso vascular como o NO. Também foi observado que o DM, bem como o processo inflamatório, estão intimamente ligados a complicações vasculares em humanos, uma vez que essas condições aumentam a expressão de moléculas responsáveis pela adesão de leucócitos na superfície das células endoteliais, propiciando a migração das células inflamatórias para os tecidos e agravando ainda mais o processo de disfunção vascular (LAHOZA; MOTALZA, 2007; DASU; JIALAL, 2010; GALVÃO, 2014).

Mediante os estudos que comprovam o papel do PVAT na modulação da função de vasos sanguíneos e da concomitante presença de um quadro inflamatório crônico de baixo grau associado a doenças cardiovasculares como na hipertensão arterial, obesidade e DM, é de suma importância investigar o efeito modulatório do PVAT nestas condições.

2.7 DIABETES MELLITUS E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES

Prejuízos na função cardíaca são achados comuns em pacientes com diabetes mellitus assintomáticos, mesmo na ausência de doenças de base como HAS e DAC atribuídas à cardiopatia diabética (BOLDINA; ABEL, 2007).

Os riscos para o comprometimento da função miocárdica em pacientes diabético se correlacionam positivamente com a presença de outras doenças como HAS, DAC, neuropatias e estresse. Indivíduos nestas condições em comparação aos normais apresentam prejuízos da função ventricular tanto sistólica quanto diastólica (RIJZEWIJK et al, 2009).

Um dos achados mais recorrentes na cardiopatia diabética é a disfunção diastólica que por sua vez é caracterizada por um comprometimento no relaxamento e preenchimento passivo do ventrículo esquerdo, comprometendo o débito cardíaco dos pacientes, além de diminuição na fração de ejeção ventricular esquerda e deposição de colágeno e produtos finais da glicação, reduzindo assim a elasticidade dos cardiomiócitos. A disfunção sistólica é uma manifestação mais tardia da cardiopatia diabética geralmente ocorrendo após a disfunção diastólica ventricular, comprometendo as funções mecânicas cardíacas nesses pacientes (VAN HEEREBEEK; HAMDANI; HANDOKO et al, 2008; LAAKSU, 2011). Alterações e anormalidade metabólicas como a hiperglicemia, resistência à insulina e dislipidemias são essenciais para a patogênese da cardiopatia diabética. Estas desencadeiam estímulos mal adaptativos que levam à deposição de colágeno e consequente fibrose de cardiomiócitos (BOLDINA; ABEL, 2010).

Estudos tem mostrado que o aumento da resistência à insulina característico no DM 2 é gatilho para o aumento da produção de superóxido por células endoteliais arteriais e que a síntese aumentada destas substâncias conduz aos sinais pró-inflamatórios envolvidos no processo de disfunção cardíaca e vascular (LAAKSO, 2011).

A principal causa de mortalidade nos pacientes diabéticos são as DCVs, as quais estão exacerbadas na presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS). A HAS e o DM estão intimamente interligados e compartilham fatores de riscos. Estados hipertensivos e hiperglicêmicos não controlados podem resultar em disfunções cardiovascular graves, resultantes de processos como a disfunção endotelial, inflamação vascular, remodelamento arterial e aterosclerose. Os mecanismos vasculares envolvidos na lesão endotelial que levam à micro ou macroangiopatia envolvem a produção de espécie reativas de oxigênio (ROS), inflamação e ativação do sistema imune (PETRIE et al., 2017; CLELAND, 2012; HOOGWERF; SFERRA; DONLEY, 2006; TUDIES et al, 2012).

Os distúrbios microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (acidente vascular encefálico e doença cardíaca isquêmica) são bastantes frequentes entre os pacientes diabéticos e resultam em impacto bastante significativo nos índices de morbidade e mortalidade. A presença do diabetes em mulheres confere maior risco de complicações macrovasculares em relação aos homens. Nesses, o comprometimento microvascular é mais comum. Adicionalmente, a doença leva a processos aterogênicos e comprometimento do funcionamento do endotélio vascular em ambos os sexos (WILD, 2004; BILKAN, 2017).

A aterosclerose é considerada a principal doença que acomete as pessoas com DM e confere risco duas vezes maior para o desenvolvimento de DCVs e doenças da artéria coronariana (DAC), como o infarto agudo do miocárdio (IAM) (BILKAN, 2017; KATTOOR et al, 2017).

Além dos efeitos lesivos direto sobre o endotélio vascular, a hiperglicemia leva a disfunções endoteliais por ativar vias de sinalização intracelulares como a via de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que culminam em aumento do estresse oxidativo, redução na biodisponibilidade de NO e prejuízo na função vascular (TUDIES et al., 2012; KATTOOR et al., 2017).

Diversas substâncias estão envolvidas na produção de ROS, entre elas mieloperoxidases, enzimas mitocondriais, lipoxigenases e nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD⁺), esta última sendo um dos produtos finais da degradação do triptofano, todas levando a síntese de ROS e redução na biodisponibilidade de fatores relaxantes endoteliais (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017).

Essas alterações levam a ativação de fatores de transcrição citoplasmáticos subjacentes à inflamação, doença vascular e diabetes como a via do NF- κ B, os quais suportam os mecanismos que irão participar da fisiopatologia das doenças (TUDIES et al., 2012).

Estudos confirmaram que a obesidade é considerada hoje uma doença inflamatória de baixo grau, multicausal e complexa, com liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos tais como TNF- α , IL-6, leptina e adiponectinas, as quais exercem papel importante na fisiopatogenia das lesões do endotélio vascular. A exposição a longo prazo a esses mediadores causa prejuízos teciduais e orgânicos, além de propiciar o desenvolvimento de doenças crônicas como o DM e DCVs (PRADO et al., 2009; MILNER; BECKER, 2012).

Em pacientes obesos, principalmente na obesidade central/visceral, foi observada a presença de infiltrados de células do sistema imune como linfócitos, células dendríticas (CD) e macrófagos teciduais no tecido adiposo perivascular (PVAT), as quais liberam diversas

citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina – 6 (IL-6) que estão associadas com a ativação de mecanismos de resistência à insulina e hiperresponsividade vascular, fornecendo assim uma associação patológica entre a doença metabólica e distúrbios vasculares (ANTONIADES, 2017; QIU et al., 2018).

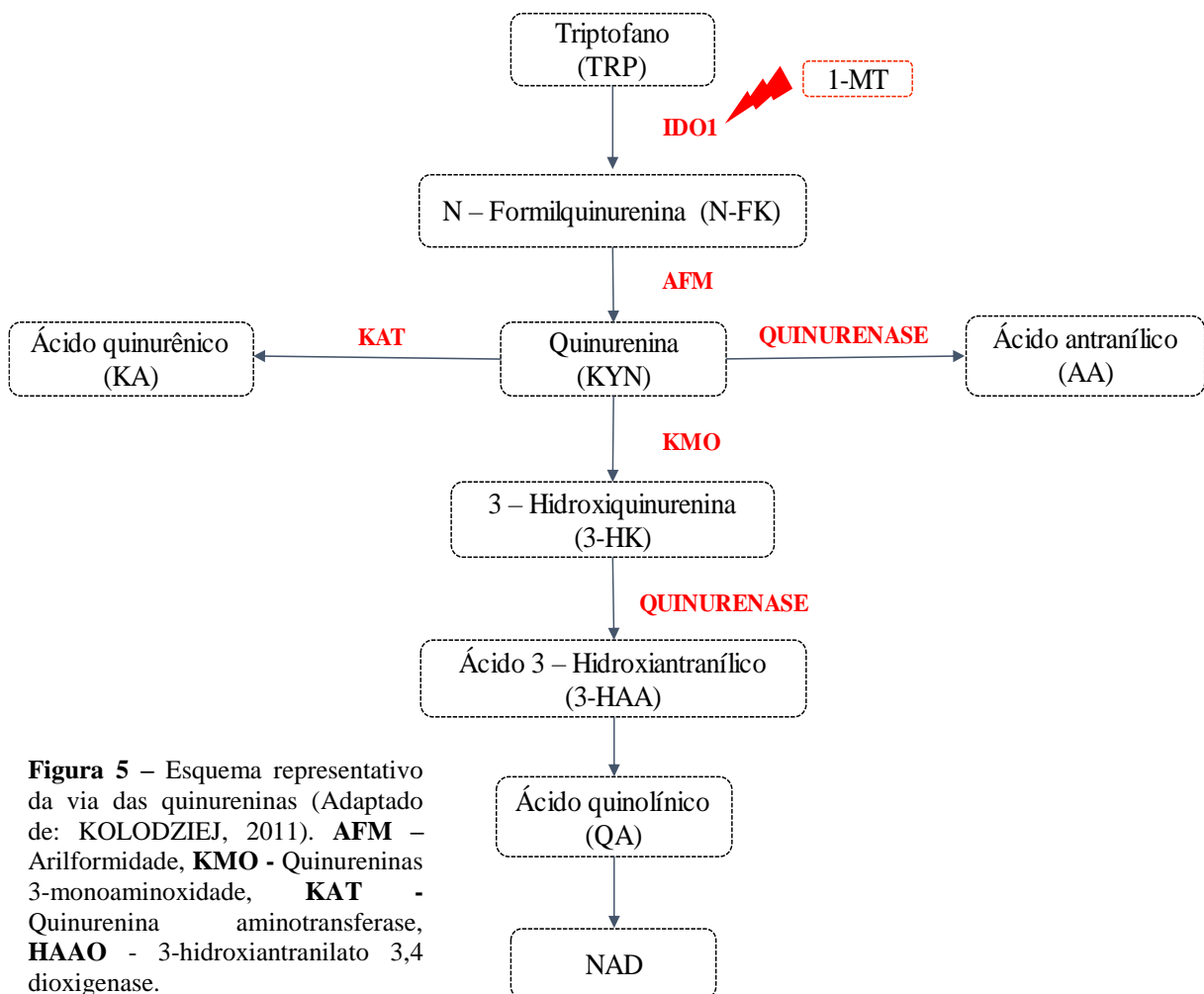
2.8 VIA DAS QUINURENINAS

As quinureninas (KYN) são pequenas biomoléculas com funções diversificadas derivadas do aminoácido essencial triptofano (TRP). São sintetizadas quando TRP é metabolizado pela via das quinureninas através de enzimas catabólicas (Figura 5). Os metabólitos do triptofano influenciam em uma gama de funções fisiológicas orgânicas e sua expressão está usualmente desregulados em condições patológicas como no DM e doenças cardiovasculares (DCVs) (KOLODZIEJ; PALEOLOG; WILLIAMS, 2011; OXENKRUG, 2015; SONG et al., 2017).

A síntese dessas moléculas bioativas se inicia quando duas enzimas catabólicas denominadas triptofano 2,3 dioxigenase (TDO) e indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), degradam o TRP em uma cascata metabólica chamada via das KYN, causando liberação de diversos subprodutos como o ácido xanturênico (XA), ácido quinurênico (KA) e a própria KYN. Além disso, outro ramo da via resulta na biossíntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD⁺), 3 -hidroxiquinurenina (3-HK) e ácido quinolínico (QA) (BREDA et al., 2016; FUJIGAKI; YAMAMOTO; SAITO, 2017; PLATTEN; WICK; VAN DEN EYNDE, 2012).

O passo metabólico inicial para formação de KYN é a degradação do TRP por três enzimas, a IDO, que se apresenta em duas isoformas (IDO-1 e IDO-2), e a TDO (triptofano 2,3 dioxigenase), convertendo o TRP em N-formilquinurenina. Esta, por sua vez, será metabolizada pela quinurenina formamidase (AFM), gerando então a KYN propriamente dita (KOLODZIEJ,

2011; POLYZOS; KETELHUTH, 2015). Três enzimas distintas podem metabolizar a KYN formando outras biomoléculas: (1) quinureninas 3-monoaminoxidase (KMO) catalisa a KYN em 3-hidroxiquinurenina (3-HK), (2) quinureninas aminotransferase (KAT) transforma a KYN em ácido quinurênico (KA), (3) quinurenase (KYNU) a transforma em ácido antranílico (AA), cada uma com funções orgânicas distintas. Toda cascata pode ser inibida por uma molécula chamada 1-metil triptofano (1-MT) muito usada em estudos da via da KYN (ALLISON et al, 2014, POLYZOS; KETELHUTH, 2015; SONG et al, 2017) (Figura 5).



Em níveis celulares a KYN além de desempenhar um papel crucial na regulação do sistema imune está envolvida também envolvido na biologia vascular e distúrbios na sua função pode levar a uma gama de doenças como câncer, inflamação crônica e hipertensão arterial. O receptor conhecido das KYN são os Aril hidrocarboneto uma proteína de 110 kDa da família do fator de transcrição PAS presentes no citoplasma de mamíferos e em muitos tecidos, importantes para o desenvolvimento fisiológico do sistema imunológico e vascular (SAVOURET et al, 2003; MEZRICH et al, 2010).

As ligações da KYN sinalizando através de seus receptores Aril hidrocarboneto espalhados pelas células orgânicas podem regular positivamente a produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição da biodisponibilidade de moléculas vasodilatadoras como o NO. A região promotora do Aril hidrocarboneto contém vários sítios de ligação para o fator de transcrição inflamatório NF-kB indicando um papel inflamatório na sinalização dos receptores de KYN, entretanto esses receptores apresentam funções tanto pró quanto antioxidante, estando desreguladas tanto em condições fisiológicas como no envelhecimento e patológicas como no diabetes e doenças cardiovasculares (KAISER et al, 2020).

2.9 VIA DA QUINURENINA E DIABETES MELLITUS

Há uma gama de estudos sobre a via das KYN mostrando que a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) está envolvida em processos de tolerância imunológica, mecanismo homeostáticos contrarreações imunes excessivas, além de diminuir o processo inflamatório comum em doenças cardiovasculares (POLYZOS; KETELHUTH, 2015). Portanto, em condições patológicas como no DM, espera-se que haja desregulação na atividade e expressão destas enzimas e dos níveis de metabólitos produzidos.

As isoformas de IDO estão supra reguladas em doenças ou condições inflamatórias. Já a TDO eleva-se em situações de estresse concomitante à elevação do cortisol. Diversos estudos tem demonstrado que citocinas inflamatórias como TNF- α e INF- γ são capazes de ativar IDO-1, regulando positivamente a via das KYN (DANESCH et al., 1983; SALTER; POGSON, 1985).

Diversos estudos têm demonstrado que os metabólitos da via da KYN têm funções anti-inflamatórias. Em um estudo *in vivo* em camundongos observou-se que a inibição farmacológica da IDO com 1-MT aumentou a inflamação vascular, além de regular positivamente a expressão de moléculas de adesão do endotélio vascular (VCAM-1) e proteína quimiotática de monócito (MCP-1), aumentando a migração de leucócitos para o vaso inflamado e agravando ainda mais a lesão vascular aterosclerótica (SZCZEPANIAK et al., 2007; ZHANG et al., 2012; POLYZOS et al., 2015).

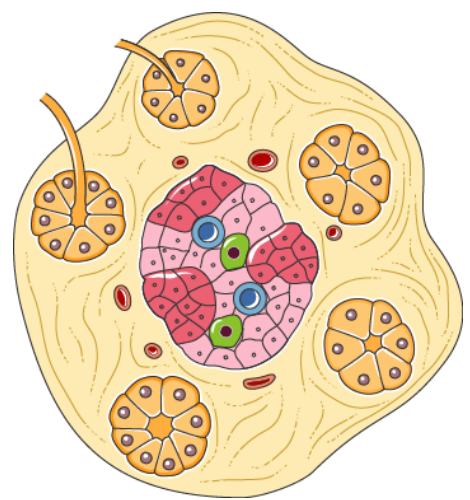
Os níveis plasmáticos de ácido xanturênico (XA) e ácido quinurênico (KA), estão aumentados em pacientes com diabetes mellitus, sendo regulados positivamente em condições como o estresse e inflamação de baixo grau como na obesidade. Tais alterações propiciam o desenvolvimento de DM 2 a partir do pré-diabetes, de maneira que há grande discussão se os níveis circulantes de metabólitos da via da KYN poderiam servir como biomarcadores para

acompanhamento do desenvolvimento, progressão e remissão terapêutica de disfunções cardiovasculares associadas ao DM (OXENCRUG et al, 2015).

Em um estudo utilizando células endoteliais porcinas observou-se que essas são sítios primários de produção de KYN e que esta age como um fator vasodilatador em vasos arteriais, contribuindo para o controle da pressão arterial (WANG et al., 2010).

A ativação desta via enzimática está diretamente relacionada ao aumento das respostas inflamatórias em diversos tecidos, incluindo o endotélio vascular e o músculo cardíaco. Assim sendo, acredita-se que nos indivíduos portadores de DM a via das quinureninas encontra-se desreguladas levando ao aumento de complicações vasculares (MALLMAN, 2014; DIAS, 2015).

Portanto, sabendo que a via da KYN está envolvida em processos patológicos como o diabetes *mellitus* e distúrbios cardiovasculares, nosso estudo tem o interesse de avaliar os efeitos do tratamento com insulina em ratos DM1 e sua associação com a via das quinureninas via análise de parâmetros metabólicos, renais e de morfologia vasculares.



OBJETIVOS

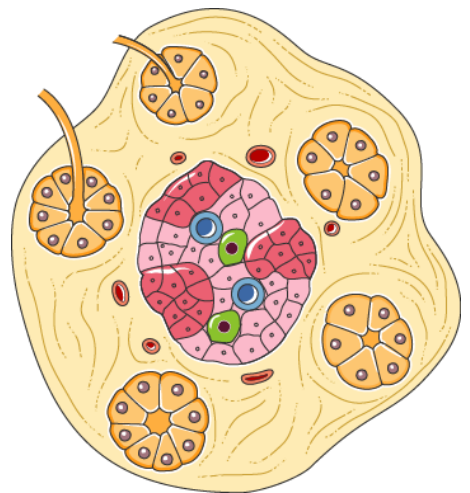
3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Relacionar os parâmetros metabólicos, renais e de função e morfologia vascular observados em ratos DM1 com a atividade da via das quinureninas na ausência ou presença de tratamento com insulina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o metabolismo corporal de ratos diabéticos e diabéticos tratados com insulina.
- Avaliar a função renal em ratos diabéticos e diabéticos tratados com insulina.
- Avaliar as alterações morfológicas vasculares associadas ao diabetes mellitus e os impactos do tratamento com insulina.
- Determinar a razão quinurenina/triptofano no plasma de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados com insulina.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar adultos (*Ratus norvegicus*) de 4-6 semanas. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (21°C), agrupados em gaiolas de polietileno e iluminação (ciclo claro/escuro de 12h), com livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Farmacologia Experimental e Morfologia Quantitativa do ICB-UFAM, além de laboratórios multiusuários do PPGIBA-UFAM.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEUA/UFAM), sob nº 043/2017 e foi realizado em conformidade com as normas estabelecidas para a manipulação de animais em experimentação. Para a realização dos ensaios experimentais, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (Figura 6).

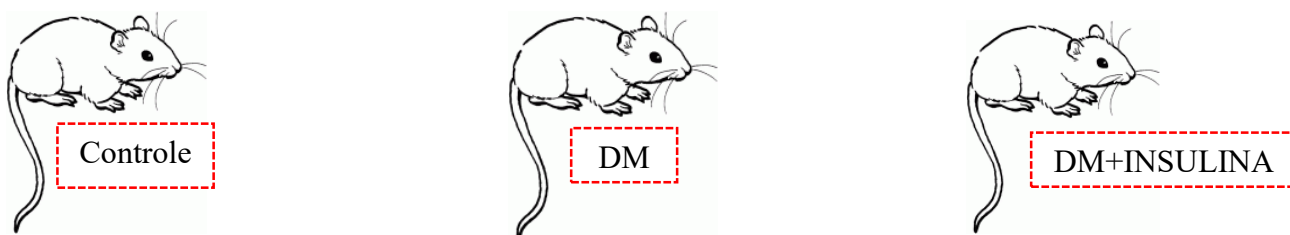


Figura 6 – Grupos experimentais.

4.1 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS

Os animais foram selecionados randomicamente para compor os grupos controle, diabético (DM) e DM tratado com insulina (DM+INS). Os animais do grupo DM e DM+INSULINA foram tratados por três dias com solução de sacarose a 20%, quando então receberam a aplicação de aloxana (100mg/kg, IP– diluída em água destilada) em duas doses com intervalo de 1 semana, para a indução do diabetes mellitus. No sétimo dia, após a segunda dose a glicemia em jejum (6 horas) foi determinada, sendo considerados diabéticos os animais

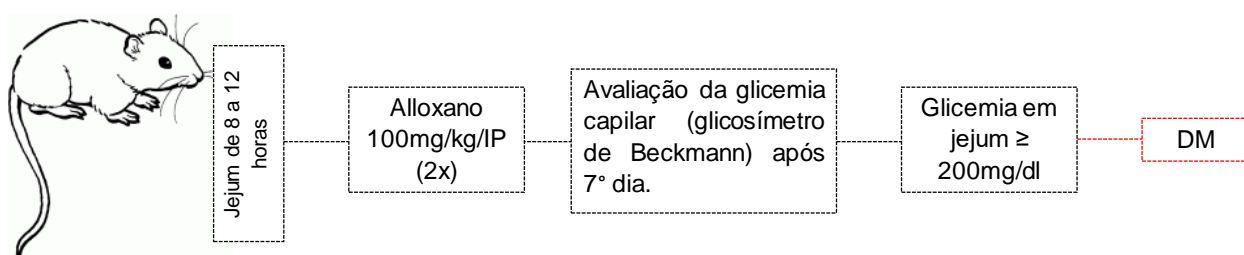


Figura 7 – Indução do DM.

que apresentaram glicemia superior a 200 mg/dl (Figura 7). O grupo DM+INS recebeu tratamento com insulina regular NOVOLIN® por 14 dias na dose de 10UI/Kg.

4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA

No teste de tolerância a insulina os animais diabéticos foram pesados e submetidos a um jejum de 6 horas. Após o período de jejum, foi administrado 10 UI/Kg de insulina regular (NOVOLIN®), por via intraperitoneal. A glicemia capilar caudal foi mensurada com glicosímetro de Beckmann (BAYER CONTOUR™ TS MS:80384380012) antes (tempo zero – glicemia basal) e após a administração da insulina nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos.

4.3 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

4.3.1 PESO CORPORAL

O peso corporal dos animais foi monitorado semanalmente em balança de alta precisão (KNWAAGEN Ltda modelo KN 2200/2 - Figura 8 A) a partir do início do tratamento (DIA 1) dia até o último dia (DIA 14).

4.3.2 GAIOLA METABÓLICA

Para avaliar parâmetros metabólicos, os animais foram alojados individualmente em gaiolas metabólicas de aço inoxidável (Figura 8 B), por um período de quatro dias consecutivos, recebendo água e ração *ad libitum*. O primeiro dia na gaiola metabólica foi para habituação, de modo que não foram computados dados de consumo e as urinas foram desprezadas. Nos três dias seguintes o consumo de ração e água foram determinados e as urinas coletadas e processadas como descrito a seguir. A média dos três dias destes parâmetros foi calculada por animal. As amostras de urina de cada coleta foram utilizadas em duplicata nos ensaios bioquímicos.

4.3.3 CONSUMO DE ÁGUA, RAÇÃO E FLUXO URINÁRIO

O monitoramento do consumo de ração foi realizado por meio de aferições diárias, onde o consumo foi calculado considerando a ração fornecida, os desperdícios e as sobras. Foram utilizados comedouros individuais e ração triturada, a qual era pesada em balança digital antes de serem postas na gaiola. O mesmo procedimento foi realizado para o registro do consumo diário de água, utilizando-se bebedouros individuais volumetricamente graduados. O consumo de água e fluxo urinário foram determinados por gravimetria, considerando 1g = 1mL. E, após

as 24h de permanência na gaiola, as urinas dos ratos foram coletadas, pesadas e alíquotadas. Todas as amostras de urina foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos em centrífuga automática (FANEM® modelo 206/1) (Figura 8 C), sendo o sedimento desprezado. Um mililitro de cada amostra foi acondicionado em tubos e mantido a -20°C para posterior avaliação. O fluxo urinário foi determinado a partir do volume de urina coletado no período de 24h. Os resultados foram expressos em mL/Kg/dia. O ritmo de filtração glomerular (mL/Kg/min) foi estimado pela depuração da creatinina endógena.

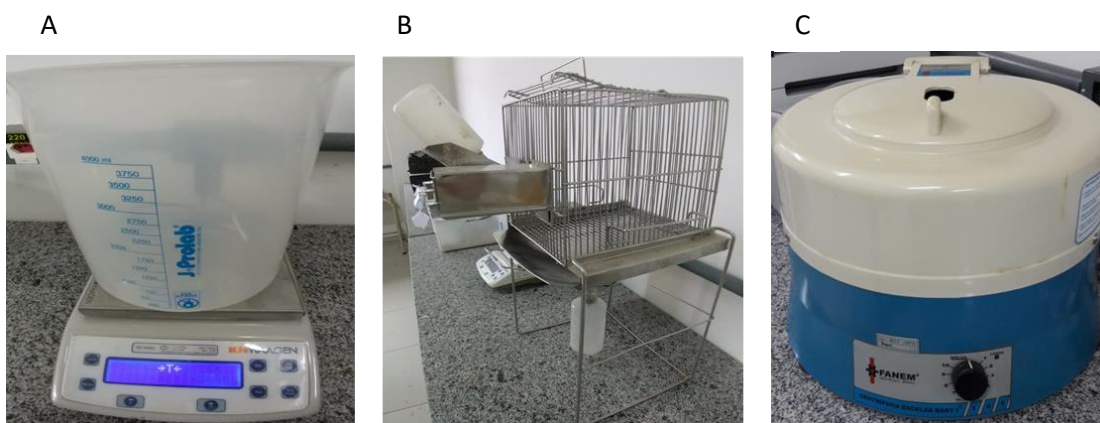


Figura 8: Balança de precisão (A), gaiola metabólica (B) e centrífuga (C).

4.4 COLETA DE SANGUE

Para coleta de sangue, os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), por via intraperitoneal. O sangue foi coletado em tubo heparinizado pelo método de punção intracárdica após abertura da cavidade torácica, a qual foi utilizada como método de eutanásia complementar. Uma vez coletado, o sangue foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos em centrífuga (FANEN ® modelo 206/1). O plasma foi isolado e acondicionado em tubos criogênicos. As amostras foram mantidas sob refrigeração (-20°C) até o momento da análise. A aorta foi dissecada para as análises histológicas.

4.4.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA E MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL

Foram determinadas as concentrações plasmáticas e urinárias de glicose, sódio, proteínas totais e creatinina. As quantificações foram realizadas em duplicata em equipamento automatizado (CHEMWELL® 2910).

- **SÓDIO** - A quantificação de sódio na urina foi determinada pelo kit BioVision. Para isso, adicionou-se 200µL de urina a 2mL do reagente colorimétrico do kit. Após a reação, as absorvâncias foram determinadas a 405nm. A fração de excreção de sódio foi determinada a partir da concentração do íon na urina, normalizada pelo fluxo urinário de 24h e peso corporal.
- **CREATININA** - Para determinar a concentração de creatinina no plasma ou na urina utilizou-se o kit Doles. Segundo as recomendações dadas pelo fabricante, foi utilizado 200µL da amostra, acrescidos de 2mL de água destilada, 0,5mL de reagente pícrico e duas gotas de solução alcalina. Posteriormente, a solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 7 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as absorvâncias foram lidas a 520nm. Os valores de concentração plasmática e urinária foram utilizados para determinação do ritmo de filtração glomerular (RFG).
- **GLICOSE** – A concentração de glicose plasmática ou urinária foi determinada pela utilização do kit Labtest. Conforme recomendações do fabricante, foram utilizados 200µL da amostra. A leitura dos ensaios foi realizada em 505 nm. A fração de excreção de glicose foi determinada a partir de sua concentração na urina, normalizada pelo fluxo urinário de 24h e peso corporal.
- **PROTEÍNAS TOTAIS** – Para determinação da concentração de proteínas totais plasmática ou urinária foi utilizado o kit Labtest. Conforme recomendações do fabricante, foi utilizado 1 mL do reagente, o qual foi incubado por 10 minutos com 200 µL da amostra, seguido de leitura no comprimento de onda de 545 nm. A fração de excreção de proteínas foi determinada a partir de sua concentração na urina, normalizada pelo fluxo urinário de 24h e peso corporal.
- **FLUXO URINÁRIO** – O fluxo urinário dos animais foi determinado pela coleta urinária de 24 horas dos animais realizando a correção pelo peso de cada animal e expressando os resultados em mL/Kg/dia.
- **RITMO DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR** – O ritmo de filtração glomerular foi determinado pela depuração endógena de creatinina e os resultados foram expressos em mL/Kg/min. Todas as análises bioquímicas plasmáticas e urinárias foram realizadas no laboratório de inovação farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A solução tampão (fase móvel) que é composta por acetato de sódio e acetonitrila elui pelo sistema cromatográfico propulsionada por uma bomba peristáltica até o mixer onde será homogeneizada. A partir daí, foi infundido pelo injetor automático 20 μ L da amostra que, juntamente com a fase móvel, passou pela coluna cromatográfica e detector. TRP e KYN foram lidos nos comprimentos de onda de 280 nm e 360 nm.

O sistema cromatográfico incluiu uma coluna C18 de fase reversa (Waters Sherisorb®, 15cm x 4,6 mm, 5 μ m, número PSS: 831913), em sistema de eluição isocrático e fase móvel constituída por acetato de sódio e acetonitrila (pH 4,0), regulado com ácido acético. O fluxo da fase móvel no sistema cromatográfico foi ajustado para uma velocidade de 1 mL/min. A análise cromatográfica das amostras de plasma de ratos foi realizada conforme o método desenvolvido e validado por Coutinho (2008), através do qual TRP e KYN foram detectados por absorção em UV a 280 nm e 360 nm respectivamente (L-4250 UV VIS Detector, Merck Hitachi), com tempo de retenção de 10 e 5 min, respectivamente, conforme demonstrado no cromatograma abaixo (Figura 9). A curva padrão de calibração foi realizada antes da realização dos experimentos para quantificação tanto de TRP quanto da KYN. Os marcadores TRP e KYN foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

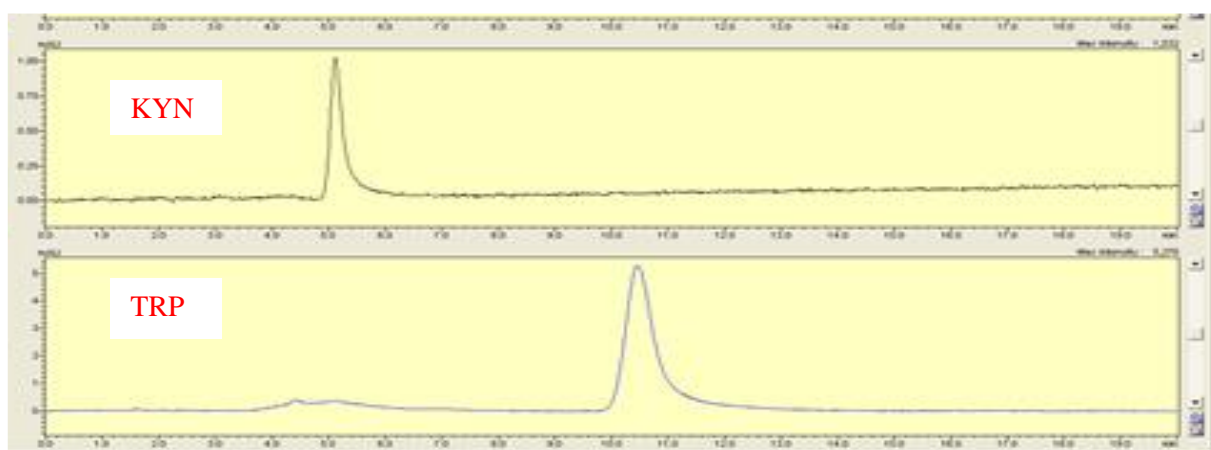


Figura 9: Cromatogramas obtidos por HPLC. (A) pico de retenção do TRP no tempo de 10 min ($\lambda = 280$ nm) e (B) pico de retenção da KYN no tempo de 5 min ($\lambda = 360$ nm)

4.5.1 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO E DAS AMOSTRAS

Para o preparo de um litro de solução tampão (fase móvel), foi pesado em balança analítica (SHIMADZU AUW 220D) 2,041g de acetado de sódio, 27 mL de acetonitrila em proveta graduada (J. PROLAB), e homogeneizado em água milli-q autoclavada. O Ph da solução foi regulado com ácido acético para 4,0.

Na preparação das amostras foram separados e identificados 4 microtubos de 1,0 mL com 200 µL de plasma sanguíneo em apenas um desses microtubos separados. Após a adição da amostra, foi pipetado 16 µL de ácido perclórico na amostra e homogeneizado por 40 segundos em agitador vórtex (GLOBAL XH-CU) ou até a diluição total do ácido ao plasma.

Realizadas todas as etapas, a amostra homogeneizada com ácido perclórico foi centrifugada (EPPENDORF 5810R) a 5.000 rpm por 10 minutos. O procedimento foi repetido por três vezes, com a transferência do sobrenadante de um microtubo para o outro.

As amostras do plasma sanguíneo de animais saudáveis, diabéticos e diabéticos tratados com insulina foram analisadas por HPLC para determinação dos níveis de TRP, KYN e da razão KYN/TRP plasmáticos.

4.6 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS VASCULARES

4.6.1 PERFUSÃO, DESIDRATAÇÃO, CORTE E COLORAÇÃO

Os animais foram pesados e sacrificados após anestesia com ketamina/xilazina (100/20mg/kg/IP). Foram submetidos à laparotomia mediana e a cavidade torácica foi aberta expondo o coração ainda pulsando. Após a coleta do sangue, foram realizadas a perfusão do animal com 60 mL de NaCl 0,9% (4°C) e formol a 10% tamponado com fosfato de sódio monobásico e bi básico. (Entrada via ventrículo esquerdo – saída átrio direito). As aortas com tecido adiposo perivascular (PVAT) dos animais foram rapidamente retiradas e fixadas em formol 10% tamponado.

Após 72 h de fixação em formol, as aortas foram desidratadas em soluções alcoólicas crescente 70% e 96% respectivamente permanecendo por um período de 24 horas cada. Após a desidratação o órgão isolado foi infiltrado com resina plástica (TECHNOVIT 7100) e álcool 96% na proporção de 1:1 (1 ml de resina/1 ml de álcool) por 24 horas. Em seguida, cada aorta foi seccionada aleatoriamente em três partes iguais as quais foram sobrepostas uma sobre a outra e sorteados com dados numéricos os

planos e eixos que cada segmento iria se orientar. Esse procedimento permite a obtenção de seções com variabilidade na disposição dos perfis de estruturas, garantindo redução no viés de amostragem e em seguida a submersão completa com resina plástica e glicol/metacrilato (TECHNOVIT 7100).

Cada bloco foi observado em estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha) e o comprimento total dos órgãos, incluído na resina, foi medido e dividido por 10, conforme o comprimento do órgão. O resultado obtido representou a distância (T) entre as seções seriais a serem obtidas em cada órgão. Essa distância foi marcada em sequência ao longo do bloco de resina e serviu de orientação para a microtomia que foi realizada em um micrótomo (Leica RM 2145, Alemanha) com uma espessura de 5 µm. As seções foram posteriormente coradas com azul de toluidina 0,5% (azul de toluidina, 0,12g; borato de Na⁺, 0,5g; H₂O destilada, 100 mL) e fucsina básica (fucsina básica, 0,5g e H₂O destilada, 100 mL) para avaliação morfológica das estruturas da parede arterial.

4.6.2 ESTEREOLOGIA COMO AVALIAÇÃO FUNCIONAL VASCULAR – DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE CAVALIERI

O princípio de Cavalieri foi empregado para a determinação do volume total dos órgãos. Esta técnica tem fundamento em análise matemática e estatística e é extremamente eficiente. O volume de qualquer estrutura pode ser obtido através do somatório das áreas das seções e pela distância entre elas. Programas avançados de contagem de pontos como o software *Imod* são utilizados.

Para determinação e quantificação do volume as seções foram digitalizadas por um estereomicroscópio ou microscópio óptico com sistema de captura de imagem (Leica EZ4D ou LeicaDM4000 Digital System, Alemanha), e sobre cada seção foi sobreposto um sistema de contagem de pontos por meio do software *Imod* versão 4.7/módulo *stereology* (KREMER et al., 1996).

São sobreposto sobre as estruturas a qual deseja-se avaliar grid em forma de cruz (Figura 11), onde contam-se apenas as estruturas que tocam o quadrante superior direito do grid permitindo a quantificação e determinação do volume de forma eficiente e precisa (GUNDERSEN et al., 1988; HOWARD, V.; REED, M. G., 2010).

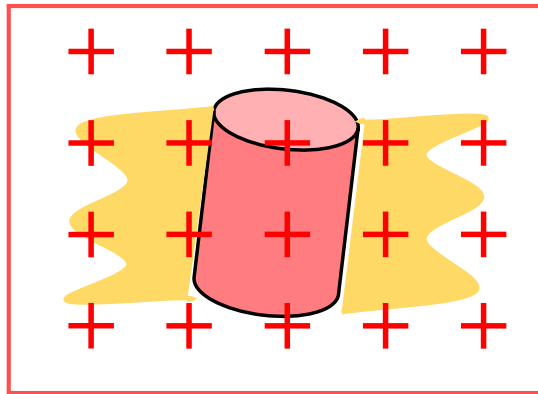


Figura 10: Grid de contagem de pontos para quantificação do volume de Cavaliere e Delesse.

A análise consiste em contar os pontos que tocam cada estrutura que deseja-se avaliar ao final com o somatório dos pontos em cada órgão é aplicado a equação:

Onde, V é o volume absoluto do órgão,

$$V = \sum_{i=1}^m P_i \cdot \frac{a}{p} \cdot T$$

$\sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre cada órgão, a/p é a área representada por cada ponto e T é a distância entre cada seção. Um coeficiente de erro de 5% e desvio padrão de 15% foram considerados aceitáveis (GUNDERSEN; ØSTERBY, 1981; GUNDERSEN et al., 1988).

4.6.3 DETERMINAÇÃO DO VOLUME RELATIVO DE DELESSE

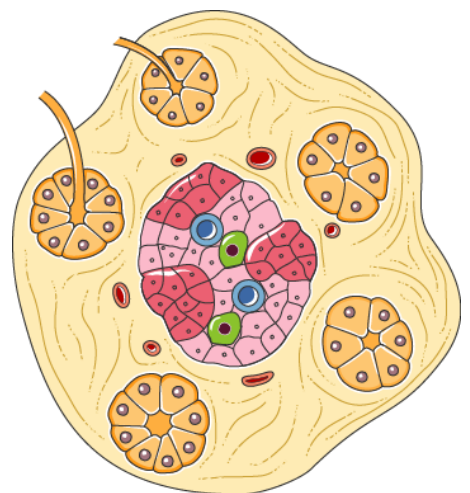
A porcentagem de cada componente interno foi obtida pelo princípio de Delesse. Um aumento de 400x foi empregado em campos de vista selecionados ao acaso. Os componentes foram quantificados pela contagem de pontos e referenciados em relação ao volume total do órgão. A porcentagem de volume ocupado por cada componente em relação ao espaço de referência (órgão) foi calculada como:

$$V_v (\text{componente, espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

Onde V_v é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa), P_{comp} é o somatório de pontos sobre os componentes do órgão (PVAT), e P_{ref} é o somatório de pontos que tocam o espaço de referência (HOWARD e REED, 2010) . Os valores percentuais foram transformados em absolutos após multiplicação pelo volume de Cavalieri.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os dados foram expressos como média \pm SEM. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico Prism (GraphPad 6.0). ANOVA com pós-teste de Tukey's ou Dunnett foram utilizados para avaliar diferenças entre os grupos. Em todos os casos, $P < 0,05$ foi considerado significativo com intervalo de confiança de 95%.



RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 INDUÇÃO DO DIABETES MELLITUS E TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA

Conforme demonstrado abaixo (Figura 11), a administração de aloxana em 2 doses de 100 mg/Kg resultou em maior taxa de sucesso com 75% (n=3) dos animais apresentando glicemia superior a 200 mg/dl (média $342,5 \pm 14,93$ mg/dL). Os animais tratados com duas doses de 50 mg/Kg apresentaram glicemia média de $98,25 \pm 7,878$ mg/dL, o que indica o não desenvolvimento do quadro hiperglicêmico. Os animais tratados com 200 mg/Kg de aloxana (DU) apresentaram mortalidade de 75% nas primeiras 24 horas (n=3), o que inviabilizou a utilização desta dose. Desta forma, para a realização dos estudos *in vivo* posteriores foi selecionada a dose de 100 mg/Kg de aloxana, administrados em duas doses com intervalo de 1 semana entre as administrações.

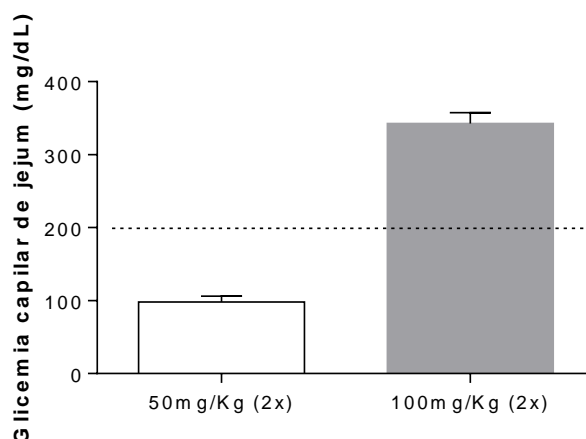


Figura 11 – Padronização da indução do diabetes mellitus na dose de 100 mg/Kg de Aloxana (2x) (n=4), demonstrando os valores glicêmicos superiores a 200 mg/dL. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Após a padronização do método de indução do diabetes mellitus, ratos controle (n=4) e diabéticos (n=4), foram submetidos ao teste de tolerância a insulina (ITT). O teste consistiu na administração de 10 UI de insulina regular cristalina de ação rápida (novolin®-Novonordisk) por via IP. A glicemia capilar foi determinada antes (tempo 0) e após 30, 60, 90 e 120 minutos da administração de insulina. As curvas glicêmicas resultantes são apresentadas a seguir (Figura 12).

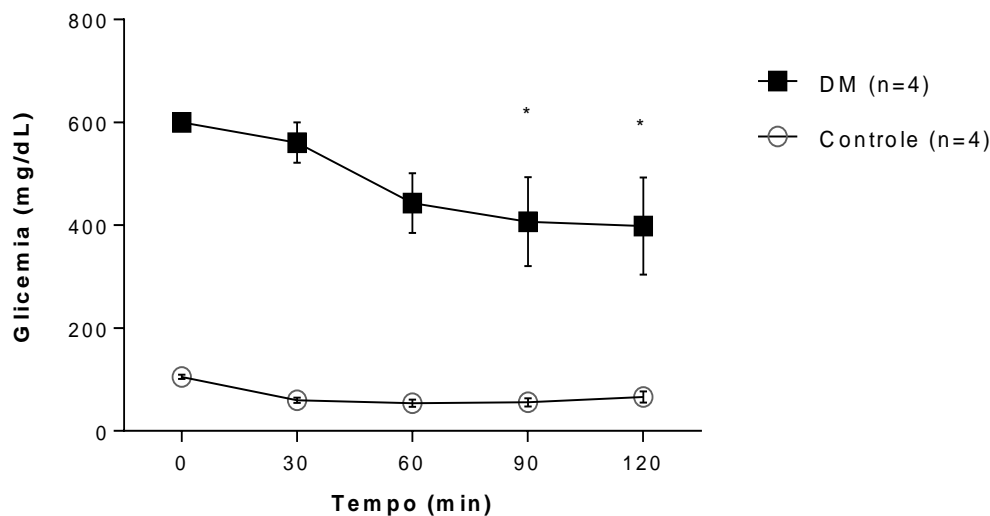


Figura 12: Teste de tolerância à insulina. Curva glicêmica em ratos normais (controle) e diabéticos (DM) antes (tempo zero) e após a administração de insulina (10 UI, IP). Os dados expressam a média \pm erro padrão da média. Two-way ANOVA. * $p < 0,05$ vs tempo zero intragrupo.

Conforme observado, a administração de insulina promoveu redução dos níveis glicêmicos de ratos diabéticos (DM) após 90 ($407,0 \pm 86,55$ mg/dL) e 120 ($398,5 \pm 94,47$ mg/dL) minutos em relação ao tempo zero ($600 \pm 46,25$ mg/dL). A dose de insulina administrada não produziu modificação significativa da glicemia de ratos saudáveis nos tempos avaliados. Os níveis glicêmicos de ratos diabéticos foram sempre superiores a ratos normais (DM vs controle, $p < 0,05$). Resposta normal à insulina em ratos diabéticos é indicativo de ausência de resistência à sua ação, quadro característico do diabetes tipo I.

5.2 ANÁLISE DO PESO CORPORAL, METABOLISMO E INSULINOTERAPIA

O peso corporal de ratos diabéticos (DM) foi menor que o observado no grupo controle ($285,4 \pm 5,11$ g vs. $207,4 \pm 5,15$ g; $p < 0,05$) (Figura 13 A). O tratamento de ratos diabéticos com insulina (10 UI, IP) foi capaz de reverter a perda de peso associada ao DM, de modo a igualar o peso de ratos DM+INS ao observado em ratos controle ($317,5 \pm 20,97$ g). Neste mesmo grupo de animais, a análise da glicemia capilar revelou elevação significativa da glicemia no grupo DM quando comparada ao controle ($407,5 \pm 16,09$ vs $132,4 \pm 13,66$ mg/dL, $p < 0,05$), a qual foi normalizada pela administração de insulina (10 UI, IP) ($142,5 \pm 5,252$ mg/dL, grupo DM+INS). (Figura 13 B).

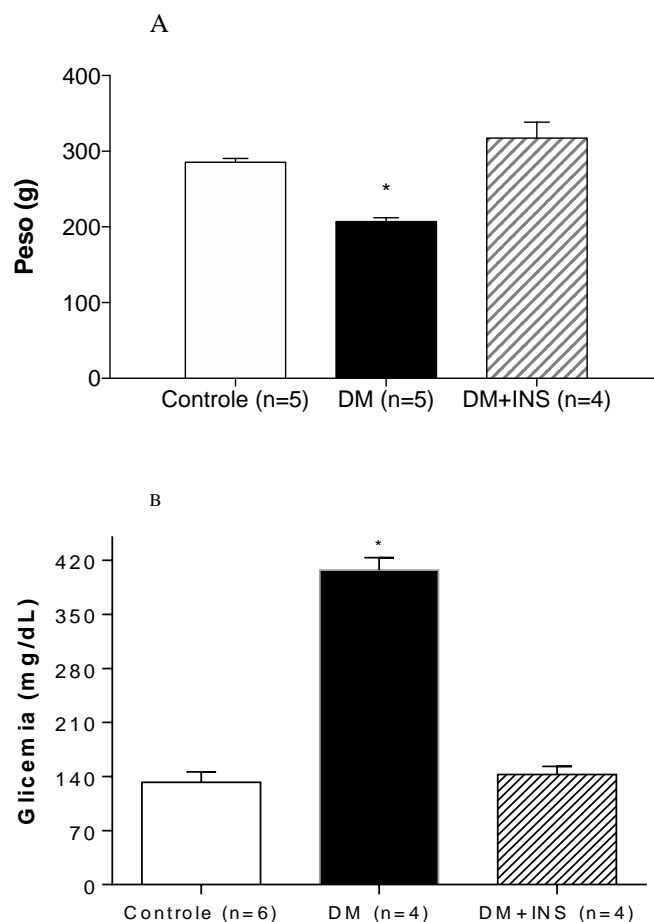


Figura 13: Análise do peso corporal A) e glicemia (B) de ratos saudáveis (controle), diabéticos (DM) e diabéticos tratados com insulina (DM+INS) (10 UI, IP) (DM+INS). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. One-way ANOVA, * $p < 0,05$ vs controle.

Observamos que a ingestão de água, o consumo de ração, bem como débito urinário foram maiores em ratos DM quando comparados ao grupo controle (Tabela 3). Tais achados reafirmam os sinais clássicos normalmente associados ao diabetes mellitus, como a polidipsia, polifagia e poliúria. Observa-se que o tratamento com insulina (10UI, IP), promoveu redução significativa do fluxo urinário e da ingestão hídrica, tornando os valores observados semelhantes ao do grupo controle. Por outro lado, o consumo de ração se manteve elevado mesmo após o tratamento com insulina na dose utilizada.

Tabela 2 – Fluxo urinário e consumo de água e ração em ratos saudáveis, diabéticos e diabéticos tratados com insulina.

	Controle	DM	DM+INS
Consumo de água (mL/Kg/dia)	38,70±5,36	179,3 ±36,61 *	106,5 ± 48,29
Consumo de ração (g/Kg/dia)	24,95±2,77	49,14 ±5,04*	55,81 ±2,85*
Fluxo urinário (mL/Kg/dia)	22,52±4,00	197,6 ±12,83*	81,05 ± 60,44
n	3	3	4

Ratos saudáveis (controle), diabéticos (DM) e diabéticos tratados com insulina (DM+INS).
* $p < 0,05$ vs controle

5.3 BIOQUÍMICA PLASMÁTICA, URINÁRIA E AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL

Na avaliação da glicose plasmática, como já esperado, animais diabéticos apresentaram hiperglicemia. O tratamento com insulina 10 UI/IP foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos plasmáticos nesses animais. Contudo ao avaliarmos a excreção urinária de glicose foi observado a presença de glicosúria nos animais diabéticos e o tratamento com insulina aumentou a excreção de glicose urinária mesmo diminuindo o fluxo urinário.

Foi possível observar uma redução dos níveis de creatinina sérico nos animais diabéticos ($p < 0,05$ vs controle) sem apresentar diferença significativa no grupo tratado com 10 UI/IP de insulina.

Contudo ao avaliarmos a fração de excreção urinária de creatinina observamos que os animais diabéticos apresentavam uma maior excreção de creatinina quando comparado ao grupo saudável ($p < 0,05$), tornando aos níveis normais com o tratamento com insulina regular 10 UI/IP.

Na avaliação da excreção de proteínas totais urinárias percebemos que os animais diabéticos apresentavam uma elevação da excreção (proteinúria) ($p < 0,05$ vs controle), com retorno aos níveis normais à insulino terapia. Entretanto, quando avaliamos o ritmo de filtração glomerular observamos que não houve diferença entre os grupos, o mesmo sendo observado quanto à excreção de sódio urinário.

Ao avaliarmos a excreção urinária observou-se que ratos diabéticos (DM) apresentaram maior fluxo urinário ($197,6 \pm 12,83$ mL/Kg/dia) que ratos saudáveis

(controle) ($22,52 \pm 4,0$ mL/Kg/dia). O tratamento de ratos diabéticos com insulina (DM+INS, 10 UI, IP) promoveu redução significativa do fluxo urinário, tornando-o semelhante ao observado em ratos controle ($81,05 \pm 60,44$ mL/Kg/dia).

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos e marcadores da função renal.

	Controle (n=3)	DM (n=4)	DM+INS (n=4)
Glicose plasmática (mg/dL)	132,4 ± 13,66	407,5 ± 16,09*	142,5 ± 5,252
Glicosúria (mL/Kg/dia)	106 ± 24,26	263,5 ± 27,47*	416,9 ± 316,9*
Creatinina plasmática (mg/dL)	1,667 ± 0,2235	0,8500 ± 0,067*	1,225 ± 0,0853
Excreção de creatinina urinária (mg/Kg/dia)	2,052 ± 0,5066	23,56 ± 6,610*	6,995 ± 5,787
Proteinúria (g/Kg/dia)	0,0379 ± 0,0112	1,142 ± 0,1971*	0,1880 ± 0,1306
Fração de excreção de Na⁺ (mM/L/Kg/dia)	5,260 ± 1,414	14,29 ± 4,376	17,74 ± 9,676
Ritmo de filtração glomerular (mL/Kg/min)	117,7 ± 26,70	231,1 ± 93,0*	87,28 ± 28,28

Ratos saudáveis (controle), diabéticos (DM) e diabéticos tratados com insulina (DM+INS).

**p < 0,005 vs controle, One-way ANOVA, pós-teste de Tukey.*

5.4 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE QUINURENINA E TRIPTOFANO PLASMÁTICAS E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA IDO

Observamos que os níveis de TRP foi reduzido nos animais diabéticos ($51,93 \pm 3,658$ μM) quando comparado aos saudáveis ($81,35 \pm 5,115$ μM). O tratamento de ratos diabéticos com insulina foi capaz de elevar os níveis de TRP ($76,72 \pm 5,986$ μM), tornando-os semelhantes a ratos controle (Figura 14 A).

Com o *n* amostral utilizado, a avaliação dos níveis plasmáticos de KYN não revelou diferenças significativas entre ratos saudáveis e diabéticos ($1,594 \pm 0,2838$ μM vs $0,4290 \pm 0,09279$ μM). Por outro lado, o tratamento com insulina promoveu

expressivo aumento de KYN plasmática em ratos diabéticos ($4.142 \pm 0,9535 \mu\text{M}$) quando comparado a ratos controle e DM (Figura 14 B).

Ao determinarmos a razão KYN/TRP, parâmetro utilizado para avaliar a atividade da IDO1, observamos não haver diferença entre os grupos controle e diabéticos ($0,02389 \pm 0,003094$ vs $0,008884 \pm 0,002170$). De maneira semelhante aos níveis plasmáticos de KYN, a razão KYN/TRP foi significativamente maior (0.06789 ± 0.01160) em ratos diabéticos tratados com insulina quando comparados a ratos controle e DM (Figura 14 C).

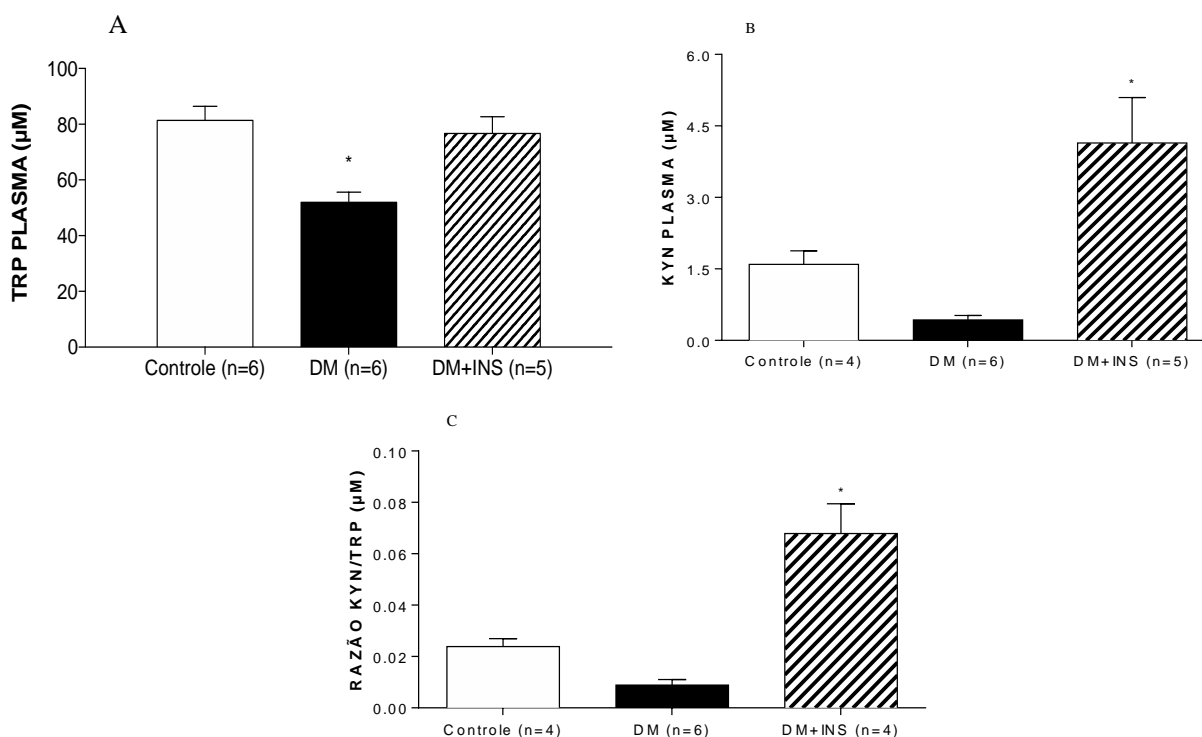


Figura 14: Determinação dos níveis de KYN e TRP plasmática e razão KYN/TRP em animais saudáveis (controle), diabético (DM) e diabéticos tratados com insulina (DM+INS). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. A) $*p < 0,05$ vs. Controle e DM+INS, B e C) $*p < 0,05$ vs. Controle e DM, One-way ANOVA, pós-teste de Tukey's.

5.5 ESTEREOLOGIA VASCULAR

5.5.1 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DE CAVALIERI

Observamos redução no volume do tecido adiposo perivascular (PVAT) em ratos diabéticos quando comparados aos saudáveis ($40,26 \pm 3,89 \text{ mm}^3/\text{Kg}$ vs. $100,5 \pm 7,075 \text{ mm}^3/\text{Kg}$, $p < 0,05$). O tratamento com insulina em animais diabéticos foi capaz reverter a perda de volume do PVAT, tornando-o semelhante ao observado em ratos saudáveis ($88,98 \pm 6,994 \text{ mm}^3/\text{Kg}$) (Figura 15 A).

A avaliação do volume da camada média da aorta revelou não haver diferenças significativas entre os grupos controle ($24,01 \pm 1,988 \text{ mm}^3/\text{Kg}$), DM ($18,77 \pm 0,9307 \text{ mm}^3/\text{Kg}$) e DM+INS ($26,33 \pm 2,354 \text{ mm}^3/\text{Kg}$) (Figura 15 B).

Observou-se redução do volume do lúmen aórtico em ratos diabéticos quando comparado ao controle ($50,06 \pm 2,720 \text{ mm}^3/\text{Kg}$ vs. $72,03 \pm 5,897 \text{ mm}^3/\text{Kg}$, $p < 0,05$), indicativo de redução da vasodilatação em ratos DM. Por outro lado, o tratamento com insulina promoveu vasodilatação, tornando o volume do lúmen aórtico nestes animais semelhante ao observado em ratos saudáveis ($61,82 \pm 3,776 \text{ mm}^3/\text{Kg}$) (Figura 15 C).

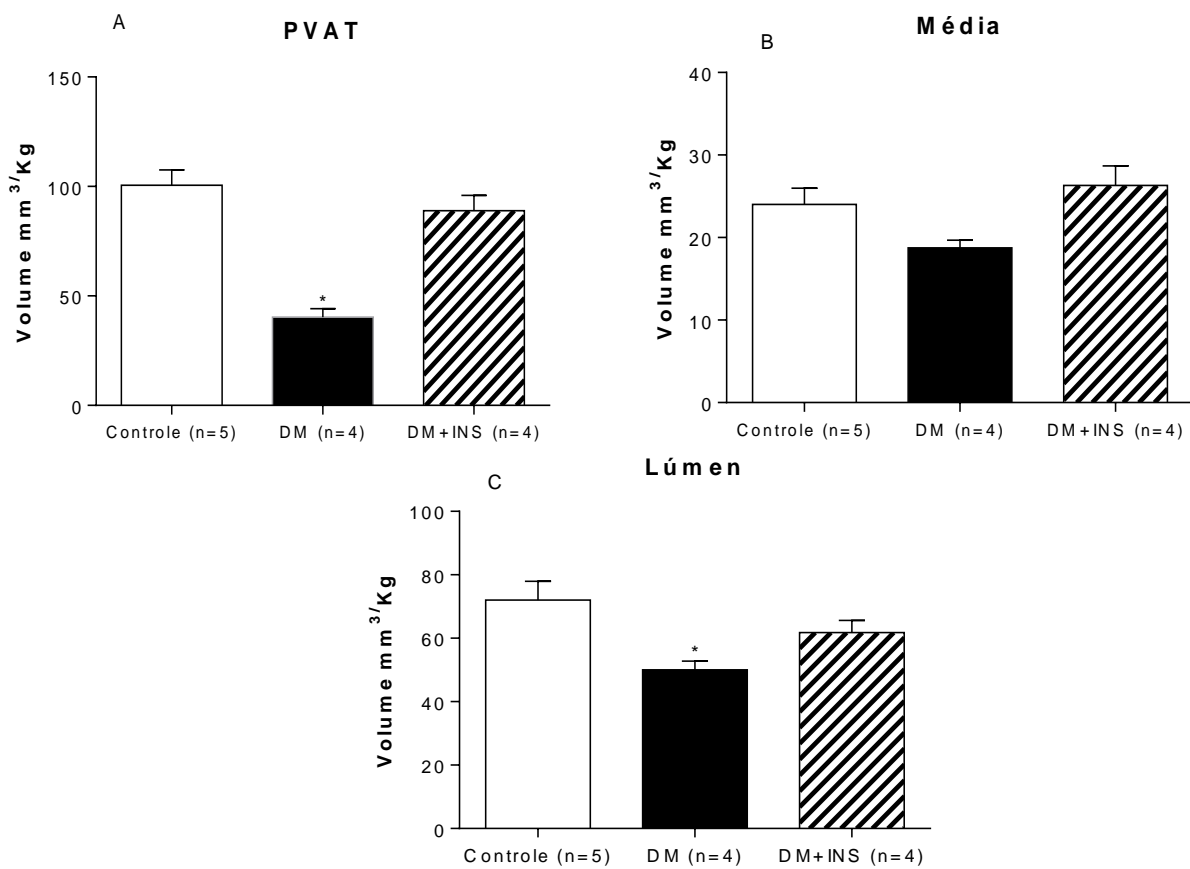


Figura 15: Avaliação de volume (A) do tecido adiposo perivascular (PVAT), (B) camada média e (C) lúmen aórticos de ratos saudáveis (controle), diabético (DM) e diabético tratado com insulina (DM+INS). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle e DM+INS, One-way ANOVA, pós-teste de Tukey's.

5.5.2 DETERMINAÇÃO DO VOLUME RELATIVO DE DELESSE

A avaliação da vasa vasorum, conjunto de pequenos vasos sanguíneos encontrados ao redor de paredes de grandes vasos na camada adventícia, revelou redução tanto do volume da camada média ($23,33 \pm 1,658 \text{ mm}^3/\text{Kg}$ vs $42,10 \pm 2,815658 \text{ mm}^3/\text{Kg}$ $p < 0,05$) quanto do lúmen ($13,96 \pm 2,948 \text{ mm}^3/\text{Kg}$ vs $56,0 \pm 6,540 \text{ mm}^3/\text{Kg}$ $p < 0,05$) de ratos DM quando comparado ao controle. O tratamento com insulina não apenas reverteu a atrofia da camada média destes vasos ($41,06 \pm 3,545 \text{ mm}^3/\text{Kg}$), como promoveu vasodilatação, com aumento do lúmen em ratos DM+INS ($47,94 \pm 3,609 \text{ mm}^3/\text{Kg}$). Tanto o volume da média e como o do lúmen da vasa vasorum foram semelhantes entre ratos DM+INS e controle (Figura 16 A e B).

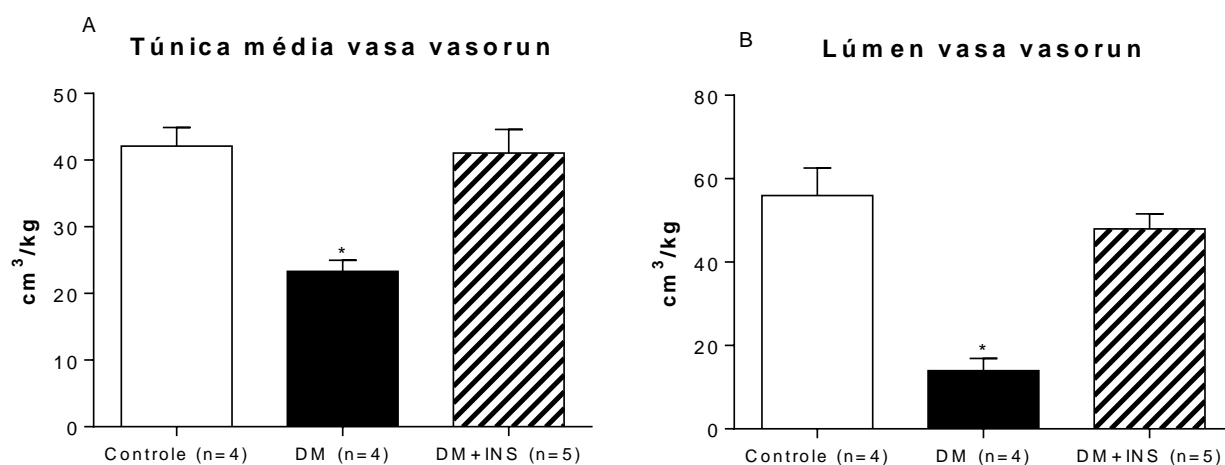
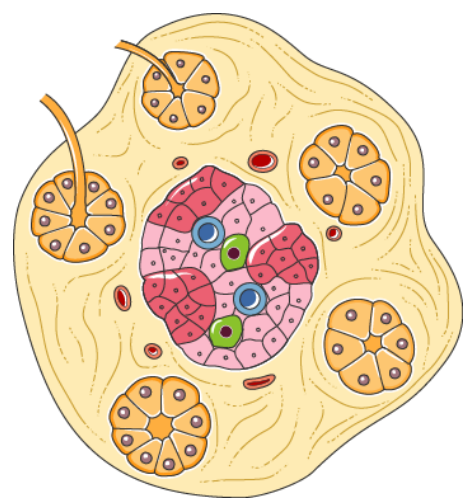


Figura 16: Avaliação da vasa vasorum (A) camada média, (B) lúmen de ratos saudáveis (controle), diabético (DM) e diabético tratado com insulina (DM+INS). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs controle e DM+INS, One-way ANOVA, pós-teste de Tukey's.



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O papel biológico da insulina na regulação dos níveis glicêmicos e atenuação da progressão de distúrbios renais, micro e macrovasculares associados ao diabetes mellitus, apesar de controverso, encontram-se bem documentados na literatura. Por outro lado, a investigação de novas vias metabólicas, elucidação de novos alvos terapêuticos e marcadores de progressão ainda se fazem necessários, haja visto o grande impacto social da doença.

A idoleamina 2,3 dioxigenase (IDO1), é a principal enzima responsável pela degradação do aminoácido essencial triptofano (TRP), sendo responsável por mais de 95% de seu catabolismo. A IDO1 inicia a produção de uma série de produtos chamados de quinureninas (KYN) cuja importância têm sido associada à funções imunoreguladoras (MBONGUE et al., 2015). Um estudo em paciente com diabetes tipo 2 observou que tanto os níveis de KYN quanto a razão KYN/TRP encontrava-se aumentados, o que é refletido por uma maior atividade enzimática da IDO causada pela liberação aumentada de citocinas inflamatórias (OXENKRUG, 2015). Em nosso estudo, utilizando modelo experimental de diabetes tipo 1 em roedores, não fomos capazes de demonstrar diferença significativa entre os níveis de KYN e atividade da IDO entre o grupo saudável (controle) e diabético (DM), apesar de uma tendência à redução. Tal tendência poderia sinalizar que a via das quinureninas poderia ser regulada de maneira distinta no DM1 e DM2. Dados preliminares de nosso grupo de pesquisa em modelos experimental de DM2 induzido por administração de baixa dose de estreptozotocina (35 mg/Kg) e pré-tratamento com frutose, por outro lado, corroboram com os achados do estudo em humanos. Oxenkrug e colaboradores (2015) também observaram que os níveis de ácido antranílico (AA), outro metabólito da via das KYN encontrava-se elevado em pacientes com diabetes tipo 1, mas não em diabetes tipo 2, mostrando diferenças bastante significativas entre ambas as condições e associando a elevação de AA ao aumento de auto anticorpos contra as ilhotas pancreáticas (OXENKRUG; DER HART; SUMMERGRAD, 2015).

Em nosso estudo observamos que os níveis de TRP encontravam-se reduzidos em ratos DM1, sem alteração significativas nos níveis plasmáticos de KYN e atividade da IDO1. Contudo, o tratamento com insulina, além de aumentar os níveis de TRP, aumentou os níveis de KYN de maneira concomitante à elevação da atividade da IDO1, demonstrando que a insulina pode modular de alguma forma essa via metabólica.

A insulina é um polipeptídeo endógeno formado por 51 aminoácidos, cuja principal efeito é armazenar substância como glicose no fígado e músculo, inibir a produção endógena hepática de glicose e regular o metabolismo de lipídeos e proteínas. Em condições fisiológicas, estimula a liberação de óxido nítrico (NO) e o relaxamento vascular, levando a efeitos hemodinâmicos (DIMITRIADIS et al., 2011; KINI et al., 2013). Estudo envolvendo pacientes com diabetes tipo 1 mostrou que a insulino terapia intensiva reduziu o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) em 42% e em 57% o risco de acidente vascular encefálico (AVE) e infarto agudo do miocárdio (IAM) (DAVID M. NATHAN et al., 2009).

A insulina é capaz de reduzir a inflamação e quimiotaxia de células inflamatórias para os tecidos, por diminuir a expressão de fatores de adesão do endotélio vascular como integrinas e selectinas, juntamente com a supressão de fatores de transcrição inflamatórios como o NF- κ B e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), atenuando assim a inflamação (AHMAD ALJADA et al., 2001; FONSECA, 2007). Portanto, sabe-se que a insulina é reguladora chave do metabolismo e inflamação orgânica, mas seus mecanismos anti-inflamatórios ainda não são totalmente compreendidos. Os resultados de Liu e colaboradores (2018) demonstraram que estados de hiperglicemia ou endotoxemia induzida por lipopolissacarídeos podem levar a estados inflamatórios, polarização de macrófagos em favor de fenótipo pró-inflamatório e estimular as lesões orgânicas. O mesmo estudo observou que a insulina pode antagonizar os efeitos inflamatório por ação direta sobre macrófagos, impedindo sua migração, infiltração e participação na lesão tecidual inflamatória (ZHU et al., 2019).

O estado de hiperglicemia característico do diabetes leva a lesão em órgãos alvo por supra regular a síntese e liberação de citocinas inflamatórias, infiltrado celular e estresse oxidativo, levando a danos diretos sobre a vasculatura, com ativação de vias de sinalização intracelular inflamatórias como a do NF- κ B e de metaloproteinases (MMP 2 e 9) envolvidas no remodelamento vascular (DANDONA et al., 2007). Estudo publicado no ano de 2018 demonstrou que o tratamento com insulina reduziu a liberação de citocinas inflamatórias como a proteína quimiotática de monócitos, IL-8, IL-6 e IL-1 em cultura de células inflamatórias humanas, demonstrando seus efeitos benéficos sobre a redução da glicemia e inflamação (BRABAZON et al., 2018). Os efeitos anti-inflamatórios e de proteção sobre a função vascular da insulina já são bem

compreendidos, entretanto, nosso trabalho traz luz para a participação de outra via metabólica, a via da quinurenina, cuja atividade parece estar diretamente relacionada aos efeitos benéficos do tratamento com insulina.

No final da década de 1990 foi observado que a IDO é primordial na tolerância imunológica e que seus altos níveis iniciam um papel vital na manutenção da relação materno-fetal, evitando assim expulsão e rejeição do feto (MUNN et al., 1998). Esses dados corroboram os resultados encontrados por outra linha de investigação de nosso grupo de pesquisa. A partir daqueles estudos pioneiros, começou a surgir interesse da comunidade acadêmica em geral sobre o papel da IDO1, TRP e KYN no processo fisiopatológico de diversas doenças.

Sabe-se que a atividade inflamatória regula a expressão de IDO em diversos tecidos e células, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células tumorais, células endoteliais e musculares lisas (POLYZOS; KETELHUTH, 2015). A IDO pode ser ativada por diversas citocinas inflamatórias como o INF- γ e TNF- α e regulada negativamente por IL-10, IL-6, regulador supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS-3), TGF- β e antígeno do linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4), podendo assim influenciar funções tolerogênicas (ORABONA et al., 2008; KETELHUTH, 2019).

Em 2010, um estudo publicado na revista Nature observou que condições inflamatórias promovem supra regulação de KYN, levando à diminuição do tônus vascular e hipotensão (WU et al., 2010). Os achados da literatura podem estar em consonância com os encontrados em nossa pesquisa, uma vez que o tratamento com insulina em animais DM1 aumentou os níveis de KYN concomitante ao aumento da vasodilatação aórtica e da vasa vasorum periaórtica, avaliadas por morfologia quantitativa.

Estudos experimentais em camundongos knockout para IDO1 mostraram que a deficiência dessa enzima aumenta os efeitos deletérios de uma dieta hipercalórica, além de aumentar a inflamação orgânica e resistência à ação da insulina, embora isso possa depender da inter-relação entre IDO1 e o microbioma intestinal (LAURANS et al., 2018; NAGANO et al., 2013). Este estudo sinaliza para um importante papel da IDO no contexto de doenças cardiovasculares. Nossos achados mostram que o tratamento com insulina aumenta os níveis de KYN e normaliza os níveis de triptofano plasmáticos, efeitos estes associados a expressivo aumento da atividade da IDO. Concomitantemente a isso, observamos melhora na vasodilatação de ratos DM. Tal

resposta poderia estar relacionada ao efeito vasodilatador da insulina produzido de forma não clássica ou funcionar como feedback negativo endógeno, atuando na tentativa de regular o tônus vascular em situações de lesão, estresse oxidativo e injúria, como o que se observa no diabetes mellitus.

Estudos *in vivo* realizados na Universidade de Oxford mostraram que a inibição da IDO1 em camundongos ApoE^{-/-} aumentou a inflamação vascular e formação da placa aterosclerótica, causando um aumento significativo de marcadores de lesão cardíaca e levando à diminuição de células reguladoras do sistema imune com Tregs e produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 na parede arterial (POLYZOS et al., 2015; YUN et al., 2016). Em contrapartida, ao contrário do que se esperava, estudos em seres humanos demonstraram que o aumento da atividade da IDO1 medida através da razão KYN/TRP está associado a um aumento da incidência de DCV, angina pectoris, IAM e morte. Entretanto outros estudos utilizando camundongos hipercolesterolêmicos observaram que a redução da IDO1 aumenta a IL-10 vascular, que por sua vez promove ateroproteção (EUSSEN et al., 2015; METGHALCHI et al., 2015).

Embora aparentemente controversos, esses resultados são extremamente intrigantes e demonstram que uma melhor compreensão do papel da via das quinureninas em processos inflamatórios e doenças cardiovasculares são necessários, sugerindo ainda que fatores imunorregulatórios dependentes de IDO1 necessitam ser melhor elucidados (KETELHUTH, 2019).

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são um conjunto de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC), partícipes de processos fisiológicos e patológicos relacionados ao remodelamento vascular. São sintetizadas e secretadas por diversas células como fibroblastos, leucócitos e células do músculo liso vascular, influenciando no remodelamento arterial, podendo servir como biomarcadores para distúrbios vasculares (WANG; KHALIL, 2018). Em vertebrados as famílias das MMPs compreendem 28 membros, sendo pelo menos 23 já descritos e expressos em seres humanos. Desses, 14 encontram-se altamente expressos na vasculatura, como a MMP-2 e a MMP-9. Tais enzimas contribuem tanto para funções fisiológicas, mas, sobretudo, estão envolvidas nas manifestações patológicas relacionadas ao remodelamento cardiovascular (VISSE; NAGASE, 2003).

A ativação da MMP-2 leva ao remodelamento adverso da MEC, principalmente pelo aumento na degradação da elastina e deposição de tecido fibroso na musculatura lisa vascular (DESK et al, 2011). Em situações inflamatórias de baixo grau como no diabetes, o microambiente rico em citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ pode contribuir para o aumento da secreção e atividade das MMPs por células inflamatórias de maneira a favorecer o remodelamento vascular patológico (VISSE; NAGASE, 2003; (WANG; KHALIL, 2018). Estudo realizado em 2010 por Cho e colaboradores observou que a inibição de MMPs de células musculares lisas vasculares da aorta de humanos leva a uma atenuação da proliferação e crescimento celular aórtica induzida por alta concentração de glicose, especialmente com a supressão da atividade da MMP-9. Em adição, estudos em camundongos knockout de MMP-9 mostraram redução na proliferação em células da musculatura lisa vascular. Coletivamente, essas evidências experimentais demonstram o efeito estimulador das MMPs na proliferação das células musculares lisas vasculares (CHO; RAIDY, 2002; LEE et al, 2010).

Em nossa pesquisa, observamos que o volume da musculatura lisa vascular da aorta de ratos DM1 permaneceu inalterado. Entretanto, quando avaliamos a vasa vasorum (vasos dos vasos), percebemos que houve uma redução da camada média arteriolar em ratos diabéticos. Nesta condição, o tratamento com insulina foi capaz de reverter a diminuição do volume da musculatura lisa vascular arteriolar, ao mesmo momento que aumentou a atividade da IDO1 e os níveis de TRP e KYN. Talvez esse efeito observado na redução da camada média da vasa vasorum possa estar relacionado ao aumento da produção de KYN, que por exercer ações imuno-reguladoras e anti-inflamatórias, produziria inibição da atividade das MMPs. Tais possibilidades serão melhor investigadas nos desdobramentos deste projeto.

Estudos realizado em cultura de células musculares lisas de aorta de ratos demonstraram que a incubação destas células com isoleucina-triptofano associados inibe a expressão e atividade da MMP-2, sugerindo que metabólitos do TRP podem, de alguma forma, estar envolvidos em respostas regulatórias do remodelamento vascular (KOPALIANI et al., 2016). Os resultados de nosso estudo apontam para uma significativa redução nos níveis de TRP plasmáticos em animais diabéticos, redução esta concomitante à atrofia da camada média da vasa vasorum periaórtica. Tais achados nos dão indícios de uma relação entre a redução nos níveis de TRP e a atividade das

MMPs, efeito esse revertido pelo tratamento com insulina. Ainda não podemos concluir de maneira definitiva sobre a relação de causa e efeito nestas condições. Entretanto, tais achados estimulam novas pesquisas sobre a relação dos metabólitos do TRP e a disfunção vascular no diabetes.

O tecido adiposo perivascular (PVAT) é atualmente reconhecido como importante colaborador na manutenção da função vascular, liberando diversas citocinas, adipocinas e moléculas que exercem efeito parácrino sob a musculatura lisa vascular. Estudos tem evidenciado que doenças cardiovasculares como a hipertensão e metabólicas como o diabetes levam a alterações morfológicas do PVAT e estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, com consequências deletérias marcantes sobre a função vascular (SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013). Nosso estudo revelou redução do PVAT na aorta de ratos DM1, a qual foi normalizada pelo tratamento com insulina. Ainda há que se investigar se tal redução de volume poderia contribuir para o comprometimento da função do PVAT sobre a regulação do tônus vascular e se os efeitos da insulina, ao melhora a vasodilatação aórtica e da vasa vasorum, seriam pelo menos em parte mediados pela normalização da morfologia deste tecido.

A visão de que o PVAT era apenas uma estrutura de suporte foi derrubada em 1991 a partir da observação de que esse tecido exerce efeito anti-contrátil em curvas concentração efeito produzidas com a adição de noradrenalina. Anos após esta descoberta, diversos pesquisadores mostraram efeito anti-contrátil exercido pelo PVAT também para outros agonistas como a fenilefrina, angiotensina II, serotonina e endotelina-1 (SOLTIS; CASSIS, 1991; FÉSÜS et al., 2007). É importante destacar que esse efeito observado pelo PVAT não é produzido apenas por sua presença física em torno dos vasos, mas essencialmente através da liberação de moléculas por ele, já que meio contendo o sobrenadante do PVAT estimulado por alguns desses agonistas demonstrou o mesmo efeito sobre vasos sanguíneos (LÖHN et al., 2002).

Um efeito comumente observado no PVAT e que leva a prejuízos na função vascular em processos patológicos é a inflamação. Neste estado, observa-se aumento do infiltrado de células inflamatórias e do estresse oxidativo, ambos achados relevantes no contexto do diabetes mellitus. Modelos de estudos utilizando ratos obesos e de diabetes mellitus tipo 2 mostram que o aumento do tecido adiposo perivascular leva à resistência a ação da insulina, bem como vasoconstrição (SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013), contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica. Diversos

estudos têm demonstrado que o PVAT funcionalmente íntegro tem importantes funções modulatória sobre a vasculatura, liberando produtos que ajudam no relaxamento vascular denominados como fatores relaxantes derivados do PVAT, tais como o óxido nítrico e as adiponectinas. Existem evidências de que condições inflamatórias levam à disfunção do PVAT, fazendo com que este passe a liberar moléculas como TNF- α , IL-6 e resistina, as quais atuam na atenuação da resposta vasodilatadora (BHATTACHARYA et al., 2013; SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013; NOSALSKI; GUZIK, 2017).

Nossos resultados em modelo DM1 demonstraram redução do volume do tecido adiposo perivascular, o qual foi acompanhado por redução do peso corporal. Adicionalmente, demonstramos que o tratamento com insulina reverte a perda de peso dos animais e do volume PVAT, achados estes concomitantes ao aumento da produção de quinureninas. Ainda há que se investigar se o tratamento com insulina, via aumento da atividade da IDO1 e maior produção de quinureninas, poderia contribuir diretamente para a diminuição do infiltrado inflamatório tecidual ao reverter as alterações morfológicas do PVAT, de modo a reestabelecer seus efeitos funcionais benéficos na regulação do tônus vascular. Nossa hipótese é de que a redução do volume do PVAT observada em nosso estudo poderia estar relacionada a prejuízos na vasodilatação em ratos DM1 via diminuição da secreção de fatores relaxantes e aumento do estresse oxidativo.

Estudos na literatura já descrevem os efeitos benéficos da insulina na melhora da vasodilatação e seus efeitos diretos no aumento da produção de NO, diminuição de citocinas inflamatórias e melhora na função vascular. Nosso estudo trouxe a observação de que o tratamento com insulina em animais DM1, além de impedir a perda de peso animal, foi capaz de reverter a redução de volume do PVAT, juntamente com o aumento da atividade de IDO1 e dos níveis de KYN. Tais efeitos parecem exercer efeitos protetores sobre a função vascular e demonstram, pelo menos em parte, o possível papel desta via na regulação da disfunção vascular associada ao diabetes.

Quanto à análise da função renal no DM1, estudos de 2017 hipotetizaram que a história natural da doença nesses pacientes inicia-se com elevação suprafisiológica do fluxo urinário e da taxa de filtração glomerular, as quais levam ao aumento da pressão de filtração glomerular, podendo causar danos irreversíveis aos néfrons e gênese da doença renal do diabetes. Logo, a hiperfunção renal é característica do estágio inicial

de desenvolvimento de prejuízo na função renal (TONNEIJCK et al., 2017). Nossos resultados mostram que ratos DM1 apresentam polidipsia e poliúria, aumento do consumo de água e do fluxo urinário, respectivamente. Esses animais possuem tendência em aumentar o ritmo de filtração glomerular quando comparado aos animais saudáveis. O tratamento de ratos DM1 com insulina demonstrou possível efeito nefroprotetor por reduzir o fluxo urinário e, possivelmente, a pressão de filtração glomerular, fatores estes que atenuariam o desenvolvimento de lesão renal. O interesse reavivado nos mecanismos fisiopatológicos da hiperfiltração glomerular como um fator que pode levar a alterações patológicas renais e estabelecer o prognóstico do diabetes pode fornecer novas perspectivas terapêuticas com base na redução da carga renal (TONNEIJCK et al., 2017). A hiperfiltração glomerular no diabetes tipo 1 tem sido associada como um importante e precoce sinal clínico da nefropatia diabética, podendo ser uma das causas do aumento da excreção de creatinina (SALCEDO-ALEJOS et al, 2005).

As diretrizes para cuidados renais e diabetes publicadas pela Associação Americana do Diabetes e Fundação Americana do Rim recomendam o controle glicêmico estrito juntamente com a redução ou manutenção dos níveis pressóricos em limiares considerados normais (NKF, 2012; ADA, 2017). Em nosso estudo, observamos que o tratamento com insulina, além de reduzir os níveis plasmático de glicose, aumentou a fração de excreção urinária dessa molécula em animais diabéticos, mesmo com redução do fluxo urinário. Desta forma, a insulina além de diminuir a pressão de filtração glomerular, estimula a excreção de glicose urinária sem afetar o fluxo urinário, o que poderia agir possivelmente como um fator protetor da função renal. Com base nisso, demonstramos que o início precoce do tratamento com insulina em ratos DM1, além de reduzir os níveis glicêmicos plasmáticos com suas consequentes repercussões, exerceu um efeito direto na diminuição da hiperfiltração glomerular, podendo assim reduzir os índices de sobrecarga renal e inibir o desenvolvimento de doença renal.

A Universidade Oxford publicou um estudo com crianças diabéticas do tipo 1 e demonstrou que a excreção de creatinina nesses pacientes estava aumentada e que o tratamento com um antagonista dos receptores de angiotensina II foi capaz de diminuir sua depuração (SALCEDO-ALEJOS et al., 2005). Nossos resultados em ratos DM1 se assemelham a esses achados, uma vez que observamos aumento da excreção

urinária de creatinina e redução de seus níveis séricos com redução do fluxo urinário em ratos DM1 que receberam o tratamento com insulina.

Bao e colaboradores observaram uma redução nos níveis plasmáticos de TRP e aumento dos níveis de KYN em pacientes com doença renal crônica quando comparado com controle saudáveis (BAO et al., 2013). A doença renal crônica é uma das principais complicações desencadeadas pelo diabetes, independentemente de sua forma clínica (KINI et al., 2013). Nossos achados utilizando o modelo de diabetes tipo 1 em roedores observou uma redução nos níveis de TRP plasmático nos animais diabéticos quando comparado aos animais saudáveis, com aumento das taxas sanguíneas dessa molécula pós tratamento com insulina. Observamos que os animais doentes apresentaram um aumento da excreção de creatinina urinária acompanhada pela elevação do fluxo urinário, sugerindo que o TRP poderia ser um biomarcador de lesão renal precoce nesse modelo e exercer efeito protetor sobre a função renal, haja visto que o tratamento com insulina aumentou seus níveis plasmáticos, reduziu a sobrecarga renal e diminuiu a excreção de creatinina endógena.

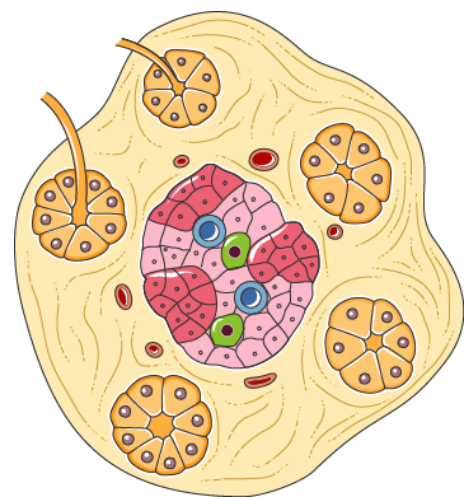
Estudos publicados em pacientes com doença renal crônica observaram um aumento da atividade da razão KYN/TRP em correlação positiva com o aumento e progressão da doença. Estudos anteriores demonstraram que a doença renal crônica leva a um estado inflamatório orgânico com elevação significativa dos níveis de INF- γ plasmático, o principal indutor da expressão de IDO (LIBERTA et al., 2001; BAO et al, 2013).

Criado e colaboradores (2009) demonstraram que o aumento da atividade da IDO reduz o acúmulo de células inflamatórias e linfócitos Th 1 nos tecidos, exercendo um efeito protetor de tolerância imunológica, aumento de células T reguladoras e supressão imune em paciente com doença renal crônica (CRIADO et al, 2009). Com nossos achados foi possível observar que 14 dias de processo patogênico do diabetes mellitus do tipo 1 não foram suficientes para causar mudanças significativas na atividade da IDO, apesar de uma tendência à sua redução. Entretanto, observamos aumento da atividade enzimática quando do tratamento de ratos DM1 com insulina. Esses achados sugerem que o tratamento com insulina desses animais levaria ao aumento da imunotolerância, redução de infiltrado inflamatório renal e melhora da função renal, fatos que necessitam ainda ser confirmados em investigações futuras.

Vries e colaboradores (2019), ao avaliarem pacientes com doença renal crônica transplantados demonstraram que as concentrações séricas de TRP eram menores naqueles que apresentaram rejeição e que a concentração plasmática de TRP também foi menor nos que evoluíram para óbito, demonstrando que quanto menor os níveis de TRP, maiores era a taxa de mortalidade por doença renal (VRIES et al., 2019) e corroborando com o entendimento do papel do TRP (e possivelmente da via das quinureninas) na imunotolerância relacionada às doenças renais e alo enxertos.

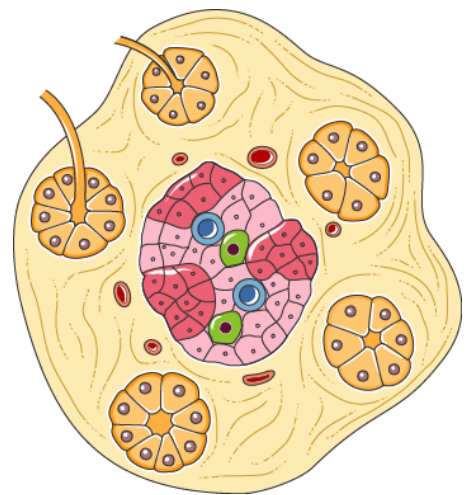
Análises de regressão linear pacientes adultos com doença renal em uso de prednisolona observaram uma forte correlação entre o aumento dos níveis de TRP e melhoras nos valores pressóricos, juntamente com a redução dos níveis glicêmicos avaliados via (HbA1c), melhoras nos parâmetros inflamatórios, de excreção urinária renal e proteinúria (VRIES et al., 2019). Nosso resultado em animais diabético demonstraram os efeitos benéficos do tratamento com insulina ao produzir correção dos níveis de TRP plasmáticos e aumentar a atividade da IDO de maneira concomitante à redução da excreção de proteína urinária quando comparado aos ratos DM1 não tratados.

Estudos com associação da via KYN/TRP sobre a secreção de insulina são bastante escassos, com um artigo publicado na década de 70 demonstrando que metabólitos da via das quinureninas como ácido 3 hidroxiantranílico e 3 hidroxiquinurenina podem bloquear a secreção de insulina. Liu e colaboradores (2015) foram os primeiro a demonstrar em células beta pancreática de ratos em cultura que a exposição aguda à KYN potencializa a secreção de insulina induzida por hiperglicemia (LIU et al., 2015). Fato é que nosso estudo observou em animais diabéticos tratados com insulina o aumento significativo nos níveis de KYN e isso pareceu exercer um efeito protetor sobre a função vascular e renal no modelo de diabetes tipo 1.



CONCLUSÃO

Muito ainda precisa ser feito no sentido de entender o papel individual dos produtos downstream da IDO e seus efeitos na modulação da função e morfologia de órgãos alvo. Nosso estudo revela que muito há a ser explorado no sentido de se determinar o real papel da via das quinureninas na lesão de órgãos alvo associadas ao DM1. Entretanto, estes novos achados trazem luz a possíveis mecanismos e rotas metabólicas que podem vir a impactar positivamente no tratamento de doenças cardiovasculares. O aumento nos níveis de triptofano, quinurenina e atividade enzimática em animais tratados com insulina observadas em nosso estudo, associadas ao ganho de peso e regeneração do tecido adiposo perivascular, inibição da atrofia da vasa vasorum, diminuição da sobrecarga renal e diminuição na excreção urinária de proteínas e creatinina com aumento da vasodilatação aórtica observados com o tratamento de ratos DM1 com insulina traz, portanto, novas perspectivas de investigação para o tratamento desses pacientes, o que pode vir a favorecer o desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras capazes de impedir a progressão e alterações micro e macro vasculares tão comum nos casos de diabetes.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTONIADES, C. “Dysfunctional” adipose tissue in cardiovascular disease: A reprogrammable target or an innocent bystander? **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 9, p. 997–998, 2017.
2. AHMAD A; HUSAM G; RANA S; PARESH D. Insulin inhibits NFkb and MCP-1 expression in human aortic endotelial cells. **Journal, The Endocrinology**. v 86, 450-453, 2001.
3. ALLISON, D. J.; DITOR, D. S. The common inflammatory etiology of depression and cognitive impairment: A therapeutic target. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2014.
4. AL-BADRI, M. R.; ZANTOUT, M. S.; AZAR, S. T. The role of adipokines in gestational diabetes mellitus. **Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism**, v. 6, n. 3, p. 103–108, 2015.
5. ALBERTO MAGANHA, C. et al. Tratament Diabetes Melitus Gestacional. **Rev Assoc Med Bras**, v. 49, n. 3, p. 330–4, 2003.
6. ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the β cell: The last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160–1171, 2012.
7. AWARENESS, D. Know the Signs and Symptoms of Thrombosis: World Thrombosis Day. n. November, p. 579–581, 2014.
8. BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy revisited. **Circulation**, v. 115, n. 25, p. 3213–3223, 2007.
9. BHATTACHARYA, I. et al. Rictor in perivascular adipose tissue controls vascular function by regulating inflammatory molecule expression. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 9, p. 2105–2111, 2013.
10. BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 1, p. 31–39, 2010.
11. BREDA, C. et al. Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 19, p. 5435–5440, 2016.
12. CHAVES FILHO, A. J. M. et al. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 80, n. October 2016, p. 234–249, 2018.

13. CLELAND, S. J. Cardiovascular risk in double diabetes mellitus-when two worlds collide. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 476–485, 2012.
14. COUTINHO. Lincoln Figueira Marins Coutinho Desenvolvimento de Instrumentação Dedicada a Cromatografia Líquida Capilar (cLC) Agradecimentos. n. cLC, 2008.
15. DANESCH, U. et al. Transcriptional regulation of the tryptophan oxygenase gene in rat liver by glucocorticoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 8, p. 4750–4753, 1983.
16. DEBNATH, S. et al. Tryptophan metabolism in patients with chronic kidney disease secondary to type 2 diabetes: Relationship to inflammatory markers. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 10, n. 1, 2017.
17. DAVID M. NATHAN et al. NIH Public Access. v. 353, n. 25, p. 2643–2653, 2009.
18. DIMITRIADIS, G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, n. SUPPL. 1, p. 52–59, 2011.
19. ERINGA, E. C.; BAKKER, W.; VAN HINSBERGH, V. W. M. Paracrine regulation of vascular tone, inflammation and insulin sensitivity by perivascular adipose tissue. **Vascular Pharmacology**, v. 56, n. 5–6, p. 204–209, 2012.
20. EUSSEN, S. J. P. M. et al. Kynurenines as predictors of acute coronary events in the Hordaland Health Study. **International Journal of Cardiology**, v. 189, p. 18–24, 2015.
21. FÖRSTERMANN, U.; XIA, N.; LI, H. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 120, n. 4, p. 713–735, 2017.
22. FONSECA, V. A. The Effects of Insulin on the Endothelium. 2007.
23. FERNÁNDEZ-ALFONSO, M. S. et al. Mechanisms of perivascular adipose tissue dysfunction in obesity. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 10–13, 2013.
24. FÉSÜS, G. et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovascular Research**, v. 75, n. 4, p. 719–727, 2007.
25. FROM, M. et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with and without type 2 diabetes mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. p. 229–234, 1998.
26. FEENER, E. P.; KING, G. L. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. **Lancet**, v. 350, n. SUPPL.1, p. 9–13, 1997.

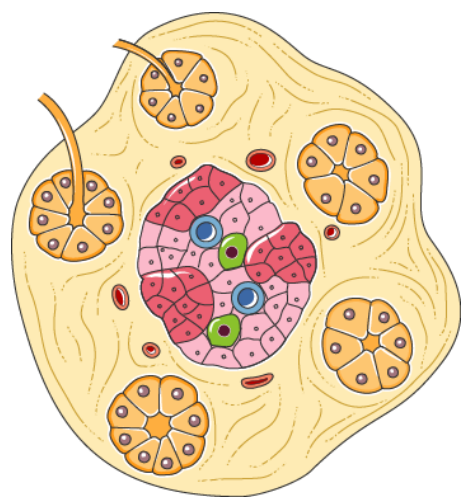
27. FUJIGAKI, H.; YAMAMOTO, Y.; SAITO, K. L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences. **Neuropharmacology**, v. 112, p. 264–274, 2017.
28. FOUNDATION, N. K. KDOQI CLINICAL PRACTICE GUIDELINE FOR DIABETES AND CKD: 2012 UPDATE NOTICE SECTION I: USE OF THE CLINICAL PRACTICE GUIDELINE. **YAJKD**, v. 60, n. 5, p. 850–886, 2012.
29. GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, n. 1-6, p. 379-394, 1988.
30. GUNDERSEN, H.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or ‘Do more less well!’. **Journal of microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65-73, 1981.
31. HENRIQUES, M. et al. Revisão de literatura diabetes tipo mody: abordagem perante os desafios diagnósticos mody. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 5, n. 1, p. 53–57, 2018.
32. HAHN, M. et al. NIH Public Access. v. 16, n. 3, p. 279–285, 2013.
33. HOOGWERF, B. J.; SFERRA, J.; DONLEY, B. G. Diabetes Mellitus-Overview. **Foot and Ankle Clinics**, v. 11, n. 4, p. 703–715, 2006.
34. HOWARD, C. V.; REED, M. G. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**. 2. ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. v. p. p. 278.
35. KATTOOR, A. J. et al. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, 2017.
36. KOPALIANI, I. et al. Whey peptide Isoleucine-Tryptophan inhibits expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in rat aorta. **Peptides**, v. 82, p. 52–59, 2016.
37. KOLODZIEJ, L. R.; PALEOLOG, E. M.; WILLIAMS, R. O. Kynurenine metabolism in health and disease. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1173–1183, 2011.
38. KEANE, K. NEWSHOLME P. Regulação Metabólica da Secreção de Insulina, 2014.
39. KETELHUTH, D. F. J. The immunometabolic role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in atherosclerotic cardiovascular disease : immune homeostatic mechanisms in the artery wall. p. 1408–1415, 2019.

40. KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of structural biology**, v. 116, n. 1, p. 71-76, 1996.
41. KINI, S. et al. Acute diabetic complications. **Emergency Medicine**, v. 38, n. 10, p. 44–51, 2013.
42. KAISER, H.; PARKER, E.; HAMRICK, M. W. Kynurenine signaling through the aryl hydrocarbon receptor: Implications for aging and healthspan. **Experimental Gerontology**, v. 130, p. 110797, 2020.
43. Libetta C, Rampino T, Dal Canton A. Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients. *Am J Kidney Dis* 38:286–95, 2001.
44. LAURANS, L. et al. Genetic deficiency of indoleamine mediated metabolic health. **Nature Medicine**, v. 24, n. August, 2018.
45. Leech CA, Dzhura I, Chepurny OG, Kang G, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. Molecular physiology of glucagon-like peptide-1 insulin secretagogue action in pancreatic beta cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 107:236–247, 2011.
46. LIU, J. J. et al. Biochimica et Biophysica Acta Expression of the kynurenine pathway enzymes in the pancreatic islet cells . Activation by cytokines and glucolipototoxicity. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 5, p. 980–991, 2015.
47. LÖHN, M. et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **FASEB Journal**, v. 16, n. 9, p. 1057–1063, 2002.
48. MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan Catabolism and Regulation of Adaptive Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p. 5809–5813, 2003.
49. MBONGUE, J. C. et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in immune suppression and autoimmunity. **Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 703–729, 2015.
50. METGHALCHI, S. et al. Homeostasis in Atherosclerosis and Colitis through Repression of Interleukin-10 Production Article Immune Homeostasis in Atherosclerosis and Colitis through Repression of Interleukin-10 Production. p. 460–471, 2015.
51. MUNN, D. H. et al. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. v. 281, n. August, p. 1191–1194, 1998.
52. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. Uma interação entre a quinurenina e o receptor de aril-hidrocarboneto pode gerar células T reguladoras. *J. Immunol* . 15 de setembro de 2010; 185 (6): 3190-8. doi: 10.4049 / **jimmunol.0903670**. 2010.

53. NOSALSKI, R.; GUZIK, T. J. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3496–3513, 2017.
54. NAGANO, J. et al. Effects of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Deficiency on High-Fat Diet-Induced Hepatic Inflammation. v. 8, n. 9, p. 1–7, 2013.
55. OXENKRUG, G. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 2, p. 294–301, 2013.
56. ORABONA, C. et al. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. p. 2–7, 2008.
57. OXENKRUG, G. F. Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 2, p. 805–810, 2015.
58. OXENKRUG, G.; VAN DER HART, M.; SUMMERGRAD, P. Elevated anthranilic acid plasma concentrations in type 1 but not type 2 diabetes mellitus. **Integrative molecular medicine**, v. 2, n. 5, p. 365–368, 2015.
59. PETRIE, J. R.; GUZIK, T. J.; TOUYZ, R. M. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 34, n. 5, p. 575–584, 2018.
60. PLATTEN, M.; WICK, W.; VAN DEN EYNDE, B. J. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. **Cancer Research**, v. 72, n. 21, p. 5435–5440, 2012.
61. POLYZOS, K. A.; KETELHUTH, D. F. J. The role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in cardiovascular disease Figure. p. 128–136, 2015.
62. POLYZOS, K. A. et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase promotes vascular inflammation and increases atherosclerosis in Apoe^{-/-} mice. **Cardiovascular Research**, v. 106, n. 2, p. 295–302, 2015.
63. POND, C. M. Accuracy and Artistry in Anatomical Illustration of Perivascular Adipose Tissue. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. December, p. 8–10, 2017.
64. QIU, T. et al. Depletion of dendritic cells in perivascular adipose tissue improves arterial relaxation responses in type 2 diabetic mice. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 85, p. 76–89, 2018.
65. R. Desk, L. Williams, K. Health, Matrix Metalloproteinases in Vascular Remodeling and Atherogenesis, (2011).
66. ROY, M. S. Proteinuria in African Americans with type 1 diabetes. v. 18, p. 69–77, 2004.

67. ROMIJN, J. A. et al. Altered Myocardial Substrate Metabolism and Decreased Diastolic Function in Nonischemic Human Diabetic Cardiomyopathy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 16, p. 1524–1532, 2009.
68. RECOMMENDATIONS, C. P. Standards of medical care in diabetes?2015 abridged for primary care providers. **Clinical Diabetes**, v. 33, n. 2, p. 97–111, 2015.
69. SALTER, M.; POGSON, C. I. The role of tryptophan 2,3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells. Effects of glucocorticoids and experimental diabetes. **The Biochemical journal**, v. 229, n. 2, p. 499–504, 1985.
70. SZASZ; BOMFIM; WEBB. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. **Vascular health and risk management**, v. 9, p. 105–116, 2013.
71. SONG, P. et al. Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 16, p. 2899–2916, 2017.
72. Soltis EE, Cassis LA. Influência do tecido adiposo perivascular na resposta do músculo liso da aorta do rato. *Clin Exp Hypertens A*. 1991; 13 (2): 277-296.
73. Sociedade Brasileira do Diabetes acesso em: <http://www.diabetes.org.br/publico/ultimas/655-criterios-para-o-diagnostico-do-diabetes-e-do-pre-diabetes>, 2014.
74. SALCEDO-ALEJOS, M. et al. Irbesartan reduces creatinine clearance in type 1 diabetic children with renal hyperfunction : a randomized , double-blind ,. n. August, p. 2120–2125, 2005.
75. SAVOURET, J. F.; BERDEAUX, A.; CASPER, R. F. The aryl hydrocarbon receptor and its xenobiotic ligands: A fundamental trigger for cardiovascular diseases. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 13, n. 2, p. 104–113, 2003.
76. STORCH, A. S. et al. Métodos de Investigação da Função Endotelial: Descrição e suas Aplicações Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, n. 3, p. e130–e137, 2017.
77. THROMBOSIS, W.; AWARENESS, D. Know the Signs and Symptoms of Thrombosis : World Thrombosis Day. n. November, p. 579–581, 2014.
78. TONNEIJCK, L. et al. Glomerular hyperfiltration in diabetes: Mechanisms, clinical significance, and treatment. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 1023–1039, 2017.

79. TUDIES, S. et al. REVIEW Genetic and Environmental Factors Associated With Type 2 Diabetes and Diabetic Vascular Complications. **The review of diabetic studies**, v. 9, n. 1, p. 6–22, 2012.
80. VAN HEEREBEEK, L. et al. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: Importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. **Circulation**, v. 117, n. 1, p. 43–51, 2008.
81. Vanhoutte PM, Félétou M. Existence of multiple endothelium-derived hyperpolarizing factor(s)?. In: Vanhoutte PM (ed.). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. The Netherlands, **Harwood Academic Publishers**, 303-5, 1999.
82. VERHEYEN, N. et al. Low-grade inflammation and tryptophan-kynurenine pathway activation are associated with adverse cardiac remodeling in primary hyperparathyroidism: The EPATH trial. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 7, p. 1034–1042, 2017.
83. VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.
84. YUN, T. J. et al. Corrections Plasmacytoid Dendritic Cells Protect against Atherosclerosis by Induction of Regulatory T Cells. n. C, p. 2016, 2016.
85. WANG, H. et al. Obesity-induced endothelial dysfunction is prevented by deficiency of P-selectin glycoprotein ligand-1. **Diabetes**, v. 61, n. 12, p. 3219–3227, 2012.
86. WANG, Y. et al. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nature Medicine**, v. 16, n. 3, p. 279–285, 2010.
87. WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. **Advances in Pharmacology**, v. 81, n. 617, p. 241–330, 2018.
88. WAJCHENBERG, B. L. et al. Cardiovascular disease in type 1 diabetes mellitus. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 52, n. 2, p. 387–397, 2008.
89. ZHANG, L. et al. The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid lowers plasma lipids and decreases atherosclerosis in hypercholesterolaemic mice. **European Heart Journal**, v. 33, n. 16, p. 2025–2034, 2012.



APÊNDICES

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE E TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR
SOBRE A DINFUNÇÃO ENDOTELIAL: REVISÃO INTEGRATIVA DA
LITERATURA**

**INFLUENCE OF OBESITY AND PERIVASCULAR ADIPOSOME TISSUE ON
ENDOTHELIAL DYNFUNCTION: INTEGRATING LITERATURE REVIEW**

Kadmiel Cândido¹ José Wilson do Nascimento Corrêa²

RESUMO

A obesidade é considerada atualmente uma epidemia global – um importante problema de saúde pública, principalmente em países ocidentais. O tecido adiposo desempenha diversas funções entre ela endócrinas. As moléculas por ele produzido influenciam diretamente sobre as funções cardiovasculares, metabólicas endócrinas e imunológicas desempenhando um papel significativo no processo saúde-doença. Com base no exposto o objetivo do trabalho e avaliar a influência do tecido adiposo perivascular sobre a disfunção endotelial vascular na obesidade. Trata-se de uma pesquisa descritiva, exploratória, qualitativa realizada através da pesquisa de artigos científicos publicados nas bases de dados de indexação de material científico. Conforme o estudo foi possível observar que a obesidade e o tecido adiposo, modulam diretamente a motricidade vascular, aumentando a resistência vascular periférica, infiltrado inflamatório, estresse oxidativo propiciando a gênese de processos patológico.

PALAVRAS-CHAVE: Disfunção endotelial; Inflamação; Obesidade; Tecido adiposo perivascular.

ABSTRACT

Obesity is currently considered a global epidemic - a major public health problem, especially in Western countries. The adipose tissue performs several functions among it endocrine. The molecules produced by it directly influence the cardiovascular, metabolic endocrine and immunological functions playing a significant role in the health-disease process. Based on the above the objective of the work and evaluate the influence of perivascular adipose tissue on vascular endothelial dysfunction in obesity. This is a descriptive, exploratory, qualitative research carried out through the research of scientific articles published in the index databases of scientific material. According to the study, it was possible to observe that obesity and adipose tissue directly modulate vascular tone, Peripheral vascular resistance, inflammatory infiltrate, oxidative stress leading to the genesis of pathological processes.

KEYWORDS: Endothelial dysfunction; Inflammation; Obesity; Perivascular adipose tissue.

¹ Discente do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA/UFAM

² José Wilson do Nascimento Corrêa professor adjunto do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM

1. INTRODUÇÃO

A obesidade hoje é considerada uma doença inflamatória, multicausal, complexa com suas peculiaridades fisiopatológicas e comorbidades associadas. Dentre as causas podem incluir fatores genéticos, culturais, orgânicos, alimentares, emocionais dentre outros, porém todos envolvidos com seu aspecto fisiopatológico (PRADO; LOFRANO; OYAMA., 2009; LEITE; ROCHA; BRANDÃO-NETO, 2009).

Estudo mostraram que o tecido adiposo (TA), além de ser altamente inflamado é responsável pela liberação de diversas citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL-6), resistina dentre outras, que secretadas a longo prazo no organismo leva a disfunções orgânicas e teciduais contribuindo para o aparecimento de doenças crônicas como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM) (PRADO; LOFRANO; OYAMA, 2009). Os distúrbios inflamatórios na obesidade desempenham um papel significativo em sua fisiopatogênica, no entanto poucos estudos abordaram diretamente como isso pode afetar diretamente as defesas e a susceptibilidade do hospedeiro ao adoecimento (MILNER; BECK, 2012).

O modo pelo qual os mediadores pró-inflamatórios levam à manifestação e complicações dessas doenças ainda não está bem explicado, porém parece envolver, entre outros, a disfunção endotelial e o estresse oxidativo (LAHOZA; MOSTAZAA, 2007). O processo inflamatório de baixo grau característico da obesidade e o DM estão associados a alterações cardíacas e vasculares em seres humanos, pois essas condições aumentam a expressão de moléculas responsáveis pela adesão de leucócitos nas células endoteliais e assim migração para os tecidos e liberação de citocinas inflamatórias aumentando a resistência vascular e agravando esses processos patológicos (DASU & JIALAL.,2010; GALVÃO.,2014).

Também foi observado que o estresse crônico é considerado um importante fator de risco para o adoecimento cardiovascular, bem como para doenças endócrinas e metabólicas como o DM e que mais estudos são necessários para elucidar e entender os processos fisiopatológicos envolvidos (OXENCRUG, 2015).

Nas últimas décadas a obesidade, excesso de peso e agora o tecido circunvizinho aos vasos sanguíneos tem sido importantes fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrais, portanto são relevantes alterações a serem estudadas. Com o avançar das pesquisas na área das ciências da saúde muitas das doenças tem ganhado uma atenção maior devido a suas altas taxas de morbimortalidade dentre elas a obesidade. Em face

disto o objetivo do artigo é avaliar a influência da obesidade e tecido adiposo perivascular (PVAT), sobre a disfunção endotelial vascular.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONCEITO DE OBESIDADE

A obesidade é considerada uma doença inflamatória, multicausal, complexa com suas peculiaridades fisiopatológicas e comorbidades associadas (PRADO; LOFRANO; OYAMA., 2009; LEITE; ROCHA; BRANDÃO-NETO, 2009). É caracterizada pelo acúmulo de tecido gorduroso no organismo resultante de um prejuízo do balanço energético onde a ingestão de energia excede a perda, levando ao aumento da produção e armazenamento de triglicérides nos adipócitos (MOLICA et al, 2015).

Antes considerado mero depósito de gordura, o tecido adiposo é visto hoje em dia como órgão endócrino e parácrino ativo, produtor de diversas citocinas inflamatórias, como as adipocinas e substâncias pró-inflamatórias, ambas influenciando diretamente no prejuízo das funções vasculares (GOMES et al 2010).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE NO BRASIL E PERSPECTIVA MUNDIAL

A Organização Mundial de Saúde (OMS), aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A projeção e perspectiva é que, em 2025, cerca de 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões, obesos. O número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo poderia chegar a 75 milhões, caso nada seja feito (ABESO, 2018).

No Brasil segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2009, a obesidade vem crescendo cada vez mais. Alguns levantamentos apontam que mais de 50% da população está acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade. Entre crianças, estaria em torno de 15% (IBGE, 2009).

De acordo com dados da ABESO 48,3% da população adulta da região norte encontra-se obesa, com crianças na faixa etária de 5-9 anos correspondendo a 25.65% e 10-19 anos com 17,45%, demonstrando o importante impacto que obesidade vem causando sobre os órgãos públicos de saúde (ABESO, 2018).

A moderna dieta ocidental associada a um estilo de vida sedentário conduziu à presente epidemia de obesidade. Atualmente é claro que a presença de obesidade aumenta substancialmente o risco de comorbidades a ela associadas, nomeadamente intolerância a

insulina, intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão, doenças vasculares entre outras e todas estão associadas a falta de uma educação alimentar (FONTANA et al, 2003).

2.3 TECIDO ADIPOSEO, CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E INFLUÊNCIA SOBRE OS VASOS SANGUÍNEOS

Estudo mostraram que o tecido adiposo (TA), além de ser altamente inflamado é responsável pela liberação de diversas citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL-6), resistina dentre outras, que secretadas a longo prazo no organismo leva a disfunções orgânicas e teciduais contribuindo para o aparecimento de doenças crônicas como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM) (PRADO; LOFRANO; OYAMA, 2009). Os distúrbios inflamatórios na obesidade desempenham um papel significativo em sua fisiopatogenia, no entanto poucos estudos abordaram diretamente como isso pode afetar diretamente as defesas e a susceptibilidade do hospedeiro ao adoecimento (MILNER; BECK, 2012).

Essas substâncias que tem função endócrinas que o tecido adiposo libera são chamadas de adipocinas, que segundo carvalho (2006), são proteínas de baixo peso molecular que participam de respostas inflamatórias e imunológicas.

A obesidade é considerada atualmente uma epidemia global – um importante problema de saúde pública, principalmente em países ocidentais (POIRIER et al, 2006). A disfunção endotelial está associada a diversas alterações vasculares, como a aterosclerose, hipertensão arterial, hiperlipidemia e diabetes mellitus, que têm em comum a resistência à insulina (RI) (CARVALHO et al, 2006).

Um estilo de vida sedentário e uma dieta rica em hidratos de carbono e gorduras são as principais causas para o aumento do número de casos de obesidade, tornando a síndrome metabólica num problema de saúde mundial. A síndrome metabólica caracteriza-se por uma combinação de alterações que incluem a obesidade abdominal, a dislipidemia, a hipertensão arterial e a resistência à insulina as quais em conjunto, aumentam significativamente o risco de diabetes tipo 2 e doença cardiovascular. (LYON et al, 2003).

O tecido adiposo em especial os que ficam próximo aos vasos sanguíneos corporais de grande calibre conhecido como tecido adiposo perivascular (PVAT), como aorta torácica, abdominais secretam diversas substâncias metabólicas que causa alterações vasculares e inflamatórias e respostas imunológicas celulares (MOLICA, 2015).

As principais fontes de citocinas (adipocinas) são os tecidos adiposos subcutâneo e visceral. Assim, aumento da massa de tecido adiposo está associado com alterações da produção de adipocinas com aumento da expressão de fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), inibidor do fator ativador de plasminogênio 1 (PAI1), e diminuição da expressão de adiponectinas no tecido adiposo, essa última por sua vez com funções protetoras ao organismo. (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006).

O óxido nítrico (NO), primariamente identificado como um fator relaxante derivado do endotélio, é um radical livre atuante na sinalização de diferentes processos biológicos, está ligado como um fator protetor de doenças cardiovasculares, devido seu efeito relaxante sobre a vasculatura. A isoforma endotelial da NOS (eNOS), expressa principalmente nas células, dos vasos sanguíneos, desempenha importante papel na regulação da resposta vascular e no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose (DIAS, 2009).

Algumas dessas citocinas como por exemplo o: α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) tem atividades inflamatórias e por causa disso são denominadas citocinas pró-inflamatórias, em contrapartida existem outras que tem função protetora aos sistemas orgânicos e como exemplo podemos citar a adiponectina que é uma citocina chamada de anti-inflamatória.

Já se tem desmostrado em vários estudos que a obesidade e o sobrepeso principalmente a obesidade central também chamada de visceral libera essas substâncias inflamatórias que levam a diversas alterações orgânicas principalmente ligada ao sistema cardiovascular. A ligação entre a inflamação induzida pela obesidade e a doença cardiovascular (DCV), sugere que o direcionamento das vias inflamatórias limita a incidência de risco cardiovascular associado ao excesso de tecido adiposo visceral e tecido adiposo perivascular (MOLICA et al, 2015). Esse acúmulo de gordura, principalmente visceral ou abdominal acaba ocasionando o maior índice de doenças cardiovasculares que estão ligadas a inflamação sistêmica e estão associados a desordens metabólicas como obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemias, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

O tecido adiposo perivascular antigamente era tido apenas como um suporte mecânico para os vasos sanguíneos e era rotineiramente removido do vaso para estudos e análises da função vascular por acharem que não exercia nenhuma função (GAO et al, 2007).

Estudos demostraram recentemente um papel adicional do endotélio vascular e do tecido adiposo perivascular (PVAT) desempenhando um importante papel no controle do sistema cardiovascular e endócrino (GAO et al., 2007; AGHAMOHAMMADZADEH et al., 2012).

Observou – se que em pessoas obesas, juntamente ao aumento de gordura abdominal e do peso corporal há um aumento do depósito de PVAT (FITZGIBBONS et al., 2014), tornando-o disfuncional e em desequilíbrio com a imunidade inata, adaptativa e os padrões de secreção inflamatórios do indivíduo, aumentando o risco e desenvolvimento das doenças cardiovasculares (CAO, 2014).

Estudos usando modelo de obesidade em animais por dieta hiperlipídica mostrou que a massa total do PVAT está aumentada nessa população de estudo com prejuízos na produção ou secreção de adipocinas, com redução de adiponectina esta última considerada um importante mediador anti-inflamatória que contribui para o funcionamento da vasculatura (KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005).

3. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura integrativa, descritiva, exploratória, qualitativa a ser realizada através da busca ativa de artigos científicos publicados nas Bibliotecas Eletrônicas da Scientific Electronic Library Online (Scielo), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Periódicos CAPES, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), NATURE Immunology, e PUBMED utilizando os descritores: Obesidade; Tecido adiposo perivascular; Inflamação; Disfunção endotelial. Foram incluídos na pesquisa artigos publicados no idioma português e inglês, que tenham sido publicados a partir de 2005. Artigos completos disponíveis online, bem como manuais do ministério da saúde e literatura cinzenta além de artigos que não foram publicados, porém disponíveis na íntegra. Não serão inclusos aqueles que não corresponderem a tais critérios. Foi elaborado um instrumento para a avaliação dos artigos selecionados para coleta e análise de dados, contemplando: Autores, ano de publicação, revisão, título do artigo, dados do objeto. Após o preenchimento do instrumento, os dados serão analisados e demonstrados em forma de tabelas elaboradas no programa Microsoft Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Influência da Obesidade e Tecido Adiposo Perivascular Sobre a Disfunção Endotelial: Revisão Integrativa da Literatura.

AUTORES	ANO	TÍTULO	REVISTA
AGHAMOHAMMADZADEH, R.; WITHERS, S.; LYNCH, F.	2012	Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target.	J. Pharmacol.
CAO, H.	2014	Adipocytokines in obesity and metabolic disease.	J Endocrinol.
CARVALHO M, COLAÇO A, FORTES Z.	2006	Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina.	Departamento de Farmacologia USP.
COSTA J, DUARTE.	2006	Tecido adiposo e adipocinas.	Actamed.
DASU, M.R.; JIALAL, I.	2010	Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via toll-like receptors.	J Pshysiol Endocrinol Metab.
DIAS R, NEGRÃO C, KRIEGER M.	2009	Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular: Ativação Celular, Reatividade Vascular e Variante Genética.	Rev. Bras. Cardiologia.
DO PRADO, W. L. ET AL.	2009	Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício.	Revista Brasileira de Medicina do Esporte
FITZGIBBONS, T.P.; CZECH, M.P.	2014	Epicardial and Perivascular Adipose Tissues and Their Influence on Cardiovascular Disease: Basic Mechanisms and Clinical Associations.	J. Heart Assoc.
GOMES, F. ET AL.	1991	Obesidade e Doença arterial coronariana: Papel da Inflamação Vascular.	SCIELO

GALVÃO, A.L.B. ET AL.	2014	Importância da inflamação na hipertensão arterial: Revisão.	Nucleus Animalium
GAO, Y.J.; LU, C.; SU, L.Y. ET AL.	2007	Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide.	British Journal of Pharmacology.
GAO, Y.J.	2007	Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction.	Curr. Pharm.
HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R.	2004.	Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema?	Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.
KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N. ET AL.	2005	Epicardial and Perivascular Adipose Tissues and Their Influence on Cardiovascular Disease: Basic Mechanisms and Clinical Associations.	J. Heart Assoc.
LAU D, YAN H, ABDEL-HAFEZ M, KERMOUNI A.	2015	Adipokines and the paracrine control of their production in obesity and diabetes.	. Int J Obes Relat Metab Disord
MOLICA F, MOREL S, KWAK B.	2015	Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular disease.	Thrombosis and Haemostasis.
MILNER, J. J.; BECK, M. A.	2012	The impact of obesity on the immune response to infection.	Proceedings of the Nutrition Society,
PRADO, W.L.; LOFRAMO, M.C.; OYAMA, L.M. ET AL.	2009.	Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações	Rev. Bras. Med. Esporte.

		Práticas para a Prescrição de Exercício.	
POIRIER P, THOMAS D, BRAY G, HONG Y, STERN J, PI-SUNYER X, ET AL.	2006	Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity	Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. Circulation.
OXENKRUG GF.	2013	Resistência à insulina e desregulação das trilhas metabólicas do dinucleótido triptofano-kinurenina e da cinereína-adenina	Mol. Neurobiol.
OXENKRUG GF. MOL NEUROBIOL.	2015	Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes.	Mol. Neurobiol.
SOUZA AS.	2016	Papel do tecido adiposo perivascular em aorta de camundongos treinados e tratados com dieta hiperlipídica	Univ. Campinas dissert. Mestrado.
SERRANO CV JR, SOUZA JA, HEINRICH RH.	2010	Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular.	Atheneu

O tecido adiposo perivascular (PVAT) é atualmente reconhecido como importante colaborador na manutenção da função vascular, liberando diversas citocinas, adipocinas e moléculas que exercem efeito parácrino sob a musculatura lisa vascular. Estudos tem evidenciado que doenças cardiovasculares como a hipertensão e metabólicas como o diabetes levam a alterações morfológicas do PVAT e estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, com consequências deletérias marcantes sobre a função vascular (SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013).

A visão de que o PVAT era apenas uma estrutura de suporte foi derrubada em 1991 a partir da observação de que esse tecido exerce efeito anti-contrátil em curvas concentração efeito produzidas com a adição de noradrenalina. Anos após esta descoberta, diversos pesquisadores mostraram efeito anti-contrátil exercido pelo PVAT também para outros agonistas como a fenilefrina, angiotensina II, serotonina e endotelina-1 (SOLTIS; CASSIS, 1991; FÉSÜS et al., 2007).

Um efeito comumente observado no PVAT e que leva a prejuízos na função vascular em processos patológicos é a inflamação. Neste estado, observa-se aumento do infiltrado de células inflamatórias e do estresse oxidativo, ambos achados relevantes no contexto do diabetes mellitus. Modelos de estudos utilizando ratos obesos e de diabetes mellitus tipo 2 mostram que o aumento do tecido adiposo perivascular leva à resistência a ação da insulina, bem como vasoconstrição (SZASZ; BOMFIM; WEBB, 2013)

Observou – se que em pessoas obesas, juntamente ao aumento de gordura abdominal e do peso corporal há um aumento do depósito de PVAT (FITZGIBBONS et al., 2014), tornando-o disfuncional e em desequilíbrio com a imunidade inata, adaptativa e os padrões de secreção inflamatórios do indivíduo, aumentando o risco e desenvolvimento das doenças cardiovasculares (CAO, 2014).

Desmostrou – se em vários estudos que a obesidade e o sobrepeso principalmente a obesidade central sintetiza e secreta substâncias inflamatórias que levam a diversas alterações orgânicas principalmente ligada ao sistema cardiovascular. A ligação entre a inflamação induzida pela obesidade e a doença cardiovascular (DCV), sugere que o direcionamento das vias inflamatórias limita a incidência de risco cardiovascular associado ao excesso de tecido adiposo visceral e tecido adiposo perivascular (MOLICA et al, 2015). Esse acúmulo de gordura, principalmente visceral ou abdominal acaba ocasionando o maior índice de doenças cardiovasculares que estão ligadas a inflamação sistêmica e estão associados a desordens

metabólicas como obesidade, diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemias, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (HERMSDORFF; MONTEIRO, 2004).

Foi visto com os estudos que o sedentarismo e a dislipidemia, aumento do peso corpora, seguidos por alterações significativas metabólicas, inflamatórias e vasculares bem como níveis circulantes de glicose, colesterol total, triglicerídeos, insulina, leptina, resistina e TNF- α apresentaram-se elevados na obesidade e distúrbios metabólicos. Observamos que a presença do tecido adiposo perivascular (PVAT) diminuiu o relaxamento dependente do endotélio, associado com redução na produção de NO vascular (SOUZA, 2016).

Estudos demonstraram um papel adicional do endotélio vascular e do tecido adiposo perivascular (PVAT) desempenhando um importante papel no controle do sistema cardiovascular e endócrino (GAO et al., 2007; AGHAMOHAMMADZADEH et al., 2012).

O TNF- α citocina considerado pró-inflamatória apresenta grande diversidade em sua atividade biológica, que perpassam desde respostas imunológicas a reações inflamatórias e neovascularização. Em condições normais, o tecido adiposo produz TNF- α , entretanto apenas uma parte do TNF- α derivado do tecido adiposo se origina do próprio adipócito, uma considerável parte pode ser secretada por macrófagos infiltrados no tecido, fato este particularmente importante na obesidade elevando o risco de doenças cardiovasculares (PRADO et al., 2009).

Juntamente ao aumento de gordura abdominal e do peso corporal há um aumento do depósito de PVAT, tornando-o disfuncional e em desequilíbrio com a imunidade inata, adaptativa e os padrões de secreção inflamatórios do indivíduo, aumentando o risco e desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Estudos usando modelo de obesidade em animais por dieta hiperlipídica mostrou que a massa total do PVAT está aumentada nessa população de estudo com prejuízos na produção ou secreção de adipocinas, com redução de adiponectina esta última considerada um importante mediador anti-inflamatória que contribui para o funcionamento da vasculatura (CAO, 2014; FITZGIBBONS et al., 2014; KADOWAKI; YAMAUCHI, 2005).

Um dos principais resultados encontrados em um estudo experimental com camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica foi relacionado a reatividade vascular que constatou que a presença do PVAT pode alterar o relaxamento dependente de endotélio em aorta torácica de camundongos sedentários. Acreditamos também que o possível (óxido nítrico) NO sintetizado pelo aumento da expressão proteica de iNOS no PVAT dos camundongos sedentários e alimentados com dieta hiperlipídica não esteja agindo no leito vascular como vasodilatador,

mas sim contribuindo para o estresse oxidativo e aumento da resistência vascular levando assim a possíveis quadros hipertensivos (SOUZA, 2016).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tecido adiposo perivascular antes considerada uma mera gordura ao redor do vaso demonstrou propriedades diretas sobre a manutenção da função vascular íntegra. Entretanto processos patogênicos como a obesidade, diabetes e hipertensão arterial, podem levar a disfunções do PVAT com perda da sua capacidade regulatória sobre a musculatura lisa vascular. Já sabe-se que a obesidade dentre outras doenças crônicas como a hipertensão e diabetes geram estado inflamatórios com ativação de vias metabólicas inerentes a inflamação culminando em infiltrado celular no PVAT, estresse oxidativo e liberação de citocinas inflamatórias diminuindo a biodisponibilidade de substâncias vasorelaxantes com um aumento da reatividade vascular periférica levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, incapacidade e morte, demonstrando uma importância de estudar-se a modulação e vias inflamatórias sobre o PVAT na obesidade e doenças em crônicas como o diabetes.

REFERENCIAS

1. AGHAMOHAMMADZADEH, R.; WITHERS, S.; LYNCH, F. et al. **Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target.** Br J Pharmacol. 165:670-682, 2012.
2. Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica. Acesso 2018.
3. CAO, H. **Adipocytokines in obesity and metabolic disease.** J Endocrinol. 220: T47– T59, 2014.
4. Carvalho M, Colaço A, Fortes Z. **Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina.** Laboratório de Hipertensão e Diabetes, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP. 2006.
5. Costa J, Duarte. **Tecido adiposo e adipocinas.** Actamed serviço de endocrinologia do hospital egas munis de Lisboa. 2006.
6. Dasu, M.R.; JIALAL, I. **Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via toll-like receptors.** Am J Pshysiol Endocrinol Metab. v.300, p.145-154, 2010.

7. Dias R, Negrão C, Krieger M. **Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular: Ativação Celular, Reatividade Vascular e Variante Genética.** 2009.
8. Do Prado, W. L. et al. **Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício.** Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v. 15, n. 5, p. 378–383, 2009.
9. FITZGIBBONS, T.P.; CZECH, M.P. **Epicardial and Perivascular Adipose Tissues and Their Influence on Cardiovascular Disease: Basic Mechanisms and Clinical Associations.** J Am Heart Assoc. 3:e000582, 2014.
10. GOMES, F. et al. **Obesidade e Doença Arterial Coronariana : Papel da Inflamação Vascular.** p. 273–279, 1991.
11. Galvão, A.L.B. et al. **Importância da inflamação na hipertensão arterial: Revisão.** Nucleus Animalium, v. 6, n. 1, p. 11, 2014.
12. GAO, Y.J.; LU, C.; SU, L.Y. et al. **Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide.** British Journal of Pharmacology. 151,323–331, 2007.
13. GAO, Y.J. **Dual modulation of vascular function by perivascular adipose tissue and its potential correlation with adiposity/lipoatrophy-related vascular dysfunction.** Curr. Pharm. Des.13, 2185–2192. 2007.
14. HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. **Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema?** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 48, n. 6, p. 803–811, 2004.
15. KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N. et al. **Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.** J Clin Invest. 2005.
16. Lau D, Yan H, Abdel-Hafez M, Kermouni A. **Adipokines and the paracrine control of their production in obesity and diabetes.** Int J Obes Relat Metab Disord; 26: S111. 2002.
17. Molica F, Morel S, Kwak B. **Adipokines at the crossroad between obesity and cardiovascular disease.** Thrombosis and Haemostasis, 2015.
18. LÖHN, M. et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **FASEB Journal**, v. 16, n. 9, p. 1057–1063, 2002.
19. MILNER, J. J.; BECK, M. A. **The impact of obesity on the immune response to infection.** Proceedings of the Nutrition Society, v. 71, n. 2, p. 298–306, 2012.

20. PRADO, W.L.; LOFRANO, M.C.; OYAMA, L.M. et al. **Obesidade e Adipocinas Inflamatórias: Implicações Práticas para a Prescrição de Exercício.** Rev Bras Med Esporte. 2009.
21. Poirier P, Thomas D, Bray G, Hong Y, Stern J, Pi-Sunyer X, et al. **Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism.** *Circulation*; 113: 898-918, 2006.
22. Oxenkrug GF. **Increased Plasma Levels of Xanthurenic and Kynurenic Acids in Type 2 Diabetes.** *Mol Neurobiol.* 52: 805, 2015.
23. Oxenkrug G. **Resistência à insulina e desregulação das trilhas metabólicas do dinucleótido triptofano-kinurenina e da cinereína-adenina.** *Mol Neurobiol* 48: 294-301, 2013.
24. Souza AS. **Papel do tecido adiposo perivascular em aorta de camundongos treinados e tratados com dieta hiperlipídica.** Uni. Campinas, 2016.
25. Serrano CV Jr, Souza JA, Heinrich RH. **Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular.** In: Nicolau JC, Marin JA. (eds.). Síndromes isquêmicas miocárdicas instáveis. São Paulo: Atheneu; v.94, n.2, p.273-279, 2010.
26. SZASZ; BOMFIM; WEBB. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. **Vascular health and risk management**, v. 9, p. 105–116, 2013.