



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM
MEDICINA**

JOÃO FILIPE CARVALHO PEREIRA MANO SIMÕES

***RESTRIÇÃO CALÓRICA NA DIABETES
TIPO 2 ASSOCIADA AO ENVELHECIMENTO***

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISILOGIA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

**PROFESSORA DOUTORA CRISTINA MARIA TRISTÃO SENA
PROFESSORA DOUTORA RAQUEL MARIA FINO SEIÇA**

09/2011



Título: Restrição Calórica na Diabetes Tipo 2 associada ao envelhecimento

Autores:

João Filipe Carvalho Pereira Mano Simões ¹

Cristina Maria Tristão Sena ²

Raquel Maria Fino Seiça ²

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

Endereço: Rua dos Combatentes, N°142, 3045-332 Coimbra

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

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



“Que a tua alimentação seja o teu tratamento e o teu tratamento a tua alimentação.”

Hipócrates, Século V a.C.



ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
I. Introdução	1
II. Materiais e Métodos	3
II.I. Animais e tratamento.....	3
II.II. Peso corporal.....	3
II.III. Recolha de amostras	4
II.IV. Determinação de parâmetros metabólicos.....	4
II.V. Estudos funcionais de vasodilatação dependente do endotélio	5
II.VI. Determinação dos níveis de anião superóxido	6
II.VII. Determinação de nitrotirosina na parede vascular	7
II.VIII. Determinação da expressão de óxido nítrico sintetase endotelial.....	7
II.IX. Determinação de marcador de inflamação	8
II.X. Análise estatística	9
III. Resultados	10
III.I. Peso corporal.....	10
III.II. Parâmetros metabólicos	11
III.III. Função endotelial	15
III.IV. Marcadores de <i>stress</i> oxidativo.....	18
III.V. Marcador de inflamação	19
IV. Discussão	21
V. Conclusões	27
VI. Referências	28



AGRADECIMENTOS

À Professora Cristina Sena, pelo conhecimento e pelo rigor, bem como pelo apoio, pela disponibilidade, pela dedicação e amizade com que me presenteou desde o 2º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

À Professora Raquel Seça, pela oportunidade de entrar neste projecto, pelo rigor e pelo activo acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho desde o 2º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

A todos os restantes docentes, investigadores e funcionários do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela sua singular disponibilidade.

À Bárbara, pela compreensão, pelo estímulo e pela partilha de ideias, imprescindíveis, por todo o carinho e serenidade.

Aos meus pais, pelo contributo fundamental para a progressão dos meus estudos e para a concretização desta etapa da minha vida.

À Professora Eduarda Ferreira e ao Professor Rui Pitarma, pelos seus esclarecimentos, sempre tão próximos e construtivos.



RESUMO

A diabetes mellitus é uma patologia em crescendo por todo o mundo. A sua mortalidade está maioritariamente associada a complicações cardiovasculares. A patogenia da doença cardiovascular na diabetes é multifactorial. Neste contexto, a disfunção endotelial é considerada determinante no aparecimento da doença vascular, resultando de distúrbios metabólicos como a hiperglicemia e a dislipidemia e o *stress* oxidativo. Algumas medidas parecem contribuir significativamente para atenuar este desequilíbrio orgânico, entre as quais, destaca-se a restrição calórica.

Este trabalho pretende estudar os efeitos da restrição calórica nos parâmetros metabólicos, na função endotelial e nos níveis de *stress* oxidativo de ratos Goto-Kakizaki, um modelo animal de diabetes tipo 2, com 12 meses de idade.

Foram criados dois grupos de estudo. Um grupo controlo com ratos Wistar e Goto-Kakizaki não sujeitos a restrição calórica e um segundo grupo sujeito a restrição calórica, com ratos Wistar e Goto-Kakizaki. Foram avaliados os parâmetros metabólicos, a capacidade de vasodilatação dependente do óxido nítrico e os níveis de anião superóxido, nitrotirosina, óxido nítrico sintetase endotelial e MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), revelando melhorias bastante significativas no grupo submetido a restrição calórica.

Este estudo permite conhecer as alterações metabólicas e vasculares na diabetes mellitus tipo 2 e respectivos efeitos benéficos da restrição calórica, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens preventivas e terapêuticas na diabetes mellitus tipo 2 associada ao envelhecimento.



Palavras-Chave:

Diabetes mellitus tipo 2

Disfunção endotelial

Stress oxidativo

Óxido nítrico

Óxido nítrico sintetase

Restrição calórica



ABSTRACT

Diabetes mellitus is a growing disease worldwide. Its mortality is mainly associated with cardiovascular complications. The pathogenesis of cardiovascular disease in diabetes is multifactorial. In this context, endothelial dysfunction is decisive in the process of vascular disease, involving metabolic disorders such as hyperglycemia and dyslipidemia and oxidative stress. Some measures contribute significantly to minimize this organic instability, especially caloric restriction.

This work intends to study the effects of caloric restriction on metabolic parameters, endothelial function and levels of oxidative stress in Goto-Kakizaki rats, an animal model of type 2 diabetes, with 12 months old.

Two groups were studied. A control group with Wistar and Goto-Kakizaki rats not submitted to caloric restriction and another group submitted to caloric restriction with Wistar and Goto-Kakizaki rats. The metabolic parameters, endothelium-dependent vasodilatation and the vascular content of superoxide anion, nitrotyrosine, endothelial nitric oxide synthase and MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) were evaluated, showing significant improvements in the caloric restriction group.

This study allowed understand the metabolic and vascular abnormalities associated to type 2 diabetes and respective beneficial effects of caloric restriction, helping to the development of new preventive and therapeutic approaches in diabetes mellitus type 2 associated with aging.



Keywords:

Diabetes mellitus type 2

Endothelial dysfunction

Oxidative stress

Nitric oxide

Nitric oxide synthase

Caloric restriction



LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs - Produtos de glicação avançada

DMT2 - Diabetes mellitus tipo 2

eNOS - Óxido nítrico sintetase

GK - Goto-Kakizaki

MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein-1

NO - Óxido nítrico

RC - Restrição calórica

W - Wistar



LISTA DE TABELAS

Tabela I. Peso corporal dos ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC) no final do tratamento.

Diminuição do peso corporal com restrição calórica.....10

Tabela II. Glicemia em jejum de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC).....11



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Apresentação gráfica da base metodológica dos estudos funcionais de vasodilatação dependente do endotélio.....6
- Figura 2.** Prova de tolerância à glicose intra-peritoneal (A) e níveis de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) (B) nos ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC) (B).....12
- Figura 3.** Níveis séricos de colesterol total (A), colesterol não-HDL (B) e triglicéridos (C) nos ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC) (C).....14
- Figura 4.** Resposta vasodilatadora da artéria aorta após administração de doses crescentes de acetilcolina (A) e após administração de doses crescentes de nitroprussiato (B).....16
- Figura 5.** Expressão de óxido nítrico sintetase em tecido aórtico. Análise *Western blot* da expressão de óxido nítrico sintetase fosforilada e total (A) e *ratio* da expressão de óxido nítrico sintetase fosforilada e total, em aorta de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos com restrição calórica (GK + RC) (B).....17
- Figura 6.** Cortes histológicos da aorta de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC), observados em microscópio de fluorescência a um comprimento de onda de 568 nm. Emissão de Brometo de Etídeo formado através da reacção do Dihidroetídeo com os iões superóxido.....18



Figura 7. Cortes histológicos da aorta de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC), observados em microscópio de fluorescência a um comprimento de onda de 485 nm. Marcação com anticorpo anti-nitrotirosina.....19

Figura 8. Cortes histológicos da aorta de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC), observados em microscópio de fluorescência a um comprimento de onda de 485 nm. Anticorpo anti-MCP-1..... 20



I. INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma patologia caracterizada por hiperglicemia crónica com crescente incidência mundial. As estimativas mundiais indicam 300 milhões de diabéticos em 2025 (Ding H & Triggler C, 2005). Em Portugal, a prevalência é elevada, cerca de 983 mil (12,3%) diabéticos (OND, 2010), reflectindo o envelhecimento da população, mas também o estilo de vida inapropriado. Apesar de a DMT2 ser mais prevalente nos países desenvolvidos, o aumento da incidência parece ser mais pronunciado nos países que passam por um período de ocidentalização (Zimmet P *et al.*, 2001).

A patologia cardiovascular é a principal causa de morbilidade e mortalidade na diabetes, sendo responsável por mais de 80% da mortalidade (Hsueh WA & Law R, 1998; Schalkwijk CG & Stehouwer CDA, 2005).

De um modo geral, o termo disfunção endotelial refere-se à incapacidade do endotélio em manter a homeostasia vascular. Simboliza a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), mas também a produção aumentada de vasoconstritores, moléculas pró-inflamatórias e pró-trombóticas (Widlansky ME *et al.*, 2003; Shahab A, 2006). A disfunção endotelial é um factor de extrema importância no desenvolvimento da aterosclerose e doença cardiovascular (Tabit CE *et al.*, 2010).

A hiperglicemia da diabetes e condições associadas, como a insulino-resistência, a hipertensão arterial, os produtos de glicação avançada (AGEs) e a dislipidemia aterogénica reduzem a vasodilatação dependente do endotélio (Creager *et al.*, 2003). Alguns dos mecanismos que conduzem a esta disfunção endotelial são conhecidos. Entre eles estão o *stress* oxidativo e a activação pró-inflamatória. Diversas origens de *stress* oxidativo são propostas, entre as quais se destacam a origem mitocondrial e os AGEs.



A cadeia respiratória mitocondrial é uma fonte de superóxido (O_2^-) e o aumento da glicose leva a uma maior produção deste anião (Brownlee M, 2001). O superóxido reage com o NO a nível endotelial e inactiva-o, produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$) (Cai and Harrison, 2000; Zou *et al.*, 2002; Molnar *et al.*, 2005;). O peroxinitrito é altamente reactivo e citotóxico e conduz à oxidação da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), inactivando-a (d'Uscio LV *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2002). Este processo culmina na redução da biodisponibilidade de NO e na menor vasodilatação dependente do endotélio. O peroxinitrito leva à formação de nitrotirosina, um marcador de *stress* oxidativo. Os AGEs resultam da glicação não-enzimática de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, com conseqüente deposição, tendo efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes (Quehenberger P *et al.*, 2000; Jakus V & Rietbrock N, 2003).

A activação pró-inflamatória é reconhecida pelo aumento da expressão de moléculas de adesão dos leucócitos, citocinas pró-inflamatórias e moléculas pró-trombóticas (Hadi AR & Suwaidi AL, 2007).

As possíveis abordagens para controlar estes eventos são largamente investigadas. Uma das quais é objecto de estudo neste trabalho. A restrição calórica (RC) possibilita uma diminuição dos níveis de glicose no sangue e um decréscimo das reservas no tecido adiposo. Verifica-se um aumento da adiponectina e diminuição do factor de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e conseqüente aumento da sensibilidade à insulina (Bordone L & Guarente L, 2005).

Este trabalho foi realizado com o objectivo de demonstrar os possíveis efeitos benéficos da RC na disfunção metabólica, oxidativa e endotelial presente na diabetes. Assim, pretende-se evidenciar uma melhoria do perfil glicémico e lipídico, uma possível melhoria da disfunção endotelial, com aumento da actividade da eNOS e da biodisponibilidade de NO, e uma atenuação do estado oxidativo e inflamatório associado.



II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.I. ANIMAIS E TRATAMENTO

Neste estudo, todos os procedimentos animais foram conduzidos de acordo com a Lei Portuguesa de Experimentação com Animais de Laboratório (2004).

Os ratos não diabéticos Wistar (W) e os espontaneamente diabéticos tipo 2 Goto-Kakizaki (GK) foram obtidos das colónias locais (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal).

Foram estudados 18 machos Wistar e 18 machos GK com 12 meses de idade. Constituíram-se 2 grupos, um grupo controlo com 9 ratos Wistar e 9 ratos GK e um grupo com 9 ratos Wistar (W + RC) e 9 ratos GK sujeitos a RC (GK + RC). O grupo controlo foi alimentado sem restrição, *ad libitum*, com dieta standard laboratorial (Dieta AO4;Panlab, Barcelona, Espanha) e tiveram livre acesso a água. O grupo experimental foi sujeito a restrição calórica de 10% durante 2 semanas, de 25% durante as 3 semanas seguintes e o restante tempo a 35% até completar os 3 meses.

Os animais foram mantidos em salas com ventilação adequada, temperatura e humidade controladas de 22-24°C e 50-60%, respectivamente, e com ciclos alternados de 12 horas de luz e obscuridade.

II.II. PESO CORPORAL

O peso corporal foi determinado em jejum antes e após tratamento.



II.III. RECOLHA DE AMOSTRAS

No final do tratamento as amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca após 15 horas de jejum, com os animais anestesiados com cloridrato de quetamina (75mg/kg) e cloridrato de clorpromazina (3mg/kg) (administração intramuscular). Na recolha das amostras foram utilizados tubos BDVacutainer com e sem EDTA (4,5 mg), de modo a obter plasma e soro, respectivamente. As amostras foram centrifugadas a 2500 r.p.m à temperatura de 4°C durante 10 minutos, aliquotadas e armazenadas a -20°C.

Posteriormente, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as aortas foram retiradas para efectuar o estudo funcional, sendo os restantes cortes de aorta congelados para posterior análise.

II.IV. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

Foram determinadas as concentrações de glicose em jejum (15 horas), no sangue total da veia da cauda do animal, recorrendo ao método da glicose-oxidase usando um glicómetro (*Glucometer Elite* - Bayer Portugal SA, Lisboa, Portugal) e tiras teste reactivas compatíveis. Realizaram-se provas de tolerância à glicose após administração intra-peritoneal de glicose (1,75g de glicose/Kg peso corporal), determinando a glicemia aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Foram determinados os valores de Hemoglobina glicada (HbA_{1c}) usando o método DCA 2000 (Bayer Portugal SA, Lisboa, Portugal).

Os níveis séricos de lípidos (Colesterol total, HDL e triglicérideos), expressos em mg/dl, foram determinados por analisador automático (Olympus-Diagnóstica, Portugal).



II.V. ESTUDOS FUNCIONAIS DE VASODILATAÇÃO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

Retiraram-se, cautelosamente, anéis vasculares da aorta de cada animal, sendo limpos de tecido conjuntivo, de modo a preservar o endotélio. Os anéis (3-4mm) foram suspensos em câmara de perfusão com capacidade de 10 ml, contendo solução de Krebs-Henseleit a pH 7,4 com a seguinte composição (mmol/L): NaCl, 118,6; KCl, 4,7; CaCl₂ 1,6; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄, 1,18; KH₂PO₄, 1,18; Glicose, 11,0. A solução foi mantida a 37°C e oxigenada com uma mistura de gases contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. Montaram-se os segmentos de aorta entre os ganchos de aço inoxidável em câmaras separadas, ligados a um suporte de um lado e a um transdutor de força (*PowerLab*) do outro. Os segmentos foram distendidos a uma tensão de 1g, estabelecida previamente como tensão ideal, através de curvas de comprimento-tensão. Os anéis da aorta foram perfundidos durante 15 minutos.

Os segmentos de aorta, com e sem endotélio, foram contraídos com fenilefrina (10⁻⁷ M).

Após estabilização da contracção, foi estudada a biodisponibilidade de NO por adição de acetilcolina (ACh) ao banho de forma cumulativa de 10⁻¹⁰ – 10⁻², enquanto o nitroprussiato de sódio (SNP) foi cumulativamente adicionado ao banho, de 10⁻¹⁰ – 10⁻⁴, como vasodilatador independente do endotélio. O relaxamento produzido pela ACh e pelo SNP foi expresso em percentagem de relaxamento a partir da contracção induzida pela fenilefrina.

Esta metodologia é baseada na vasodilatação dependente da acção do NO como ilustrado na figura 1. Nesta figura é possível verificar, que após contracção com fenilefrina, a administração de ACh provoca diminuição da tensão no vaso com endotélio, mas não no vaso sem endotélio. Do mesmo modo, ao administrar um inibidor da eNOS (L-NAME), não houve diminuição da tensão.

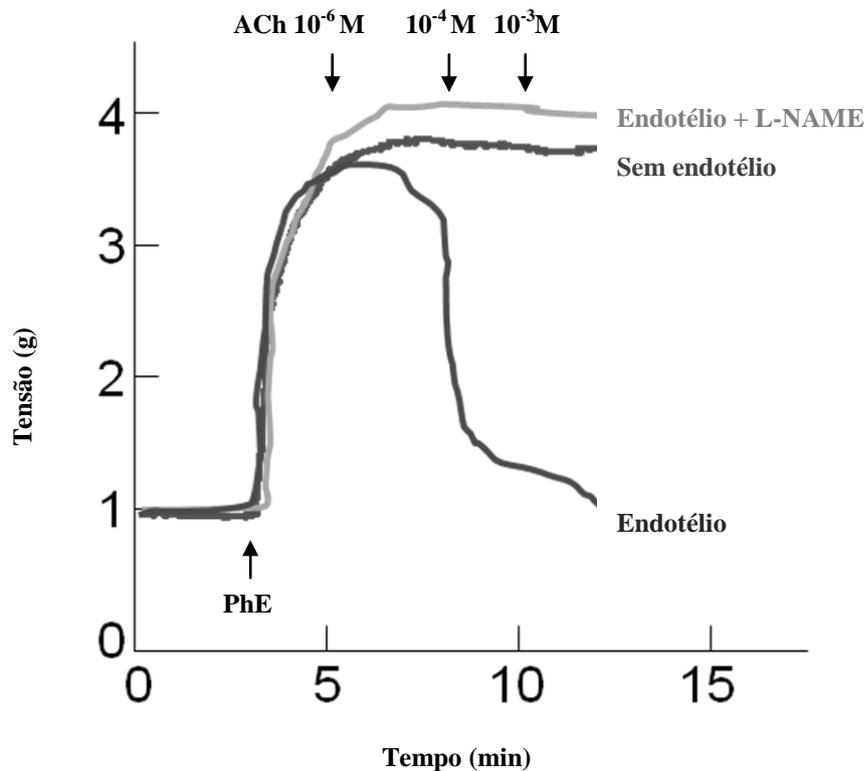


Figura 1. Apresentação gráfica da base metodológica dos estudos funcionais de vasodilatação dependente do endotélio.

PhE=Fenilefrina; ACh=Acetilcolina; L-NAME=L-Nitro-Arginine Methyl Ester.

II.VI. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANIÃO SUPERÓXIDO

Cortes histológicos de segmentos da aorta (30 μ m de espessura), congelados, não fixados, foram incubados com dihidroetídio (DHE) em solução salina fosfatada (PBS), durante 30 minutos a 37°C em câmara húmida protegida da luz. O DHE foi oxidado pelos iões O_2^- dando origem a brometo de etídio que se liga ao DNA do núcleo e emite fluorescência vermelha (Miller et al., 1998).

A detecção do brometo de etídio foi realizada usando um microscópio de fluorescência Bio-Rad MRC-600, equipado com laser kripton/árgon, utilizando um filtro de 568 nm.



As amostras de ratos diabéticos e normais foram processadas e visualizadas em paralelo. As definições de laser foram idênticas para a aquisição das imagens das diferentes amostras.

II.VII. DETERMINAÇÃO DE NITROTIROSINA NA PAREDE VASCULAR

A nitrotirosina é um marcador da formação de peroxinitrito e foi determinada na aorta através de uma estimativa dos níveis de nitração proteica, utilizando métodos imunofluorescentes. Os cortes histológicos foram descongelados e secos, seguidos de fixação em acetona (-20°). Foram re-hidratados em solução salina fosfatada até o meio de montagem (OCT) desaparecer. De seguida, permeabilizaram-se em solução salina fosfatada com Triton a 1% durante 10 minutos. As ligações não específicas foram bloqueadas com soro de cabra a 10% em solução salina fosfatada a 0,2% durante 30 minutos. Incubaram-se, então, com anticorpo primário de coelho anti-nitrotirosina (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) durante 1 noite. Em seguida, os cortes foram lavados e incubados com anticorpo secundário anti-coelho (Molecular Probes, Barcelona, Espanha), durante 1 hora. Finalmente, lavaram-se os cortes e foram observados em microscópio de fluorescência Bio-Rad MRC-600, equipado com laser kriptón/árgon, utilizando um filtro de excitação 485 nm, que permite observar a fluorescência verde representativa da presença de nitrotirosina.

II.VIII. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE ENDOTELIAL

Segmentos de endotélio intacto da aorta dos ratos foram lavados com solução salina fosfatada e arrefecidos em solução tamponada contendo (em mM) Tris-HCl 50, NaCl 150, EDTA (Ácido etileno-diaminotetracético) 1, Ácido etileno-glicol-tetracético 0,1, Nonidet P-



40 0,1%, SDS (Dodecil sulfato de sódio) 0,1% e Desoxicolato de sódio 0,5%. Fuoreto de Fenilmetilsulfonilo, 1mM; Aprotinina, 10µg/ml; Leupeptina, 10µ/ml; Pepstatina, 10µm/ml (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EUA) foram adicionados como inibidores das proteases.

Os tecidos foram homogeneizados e centrifugados a 14000g durante 20 minutos, a 4°C, sendo determinada a proteína total sobrenadante. De seguida, foi corrido o *electroblot* em membrana de nitrocelulose após a adição de 50µg de proteína ao gel SDS-PAGE a 8%, utilizando marcadores padrão de peso molecular conhecido. Os *blots* foram bloqueados através de uma solução salina fosfatada tamponada com leite magro, durante uma hora, e incubados com anticorpo anti-eNOS (Transduction Laboratory, Madrid, Espanha) durante a noite. Após a incubação primária, a membrana foi lavada com solução salina. Depois, a membrana foi incubada, durante uma hora, com anticorpos secundários ligados a uma fosfatase alcalina. Os *imunoblots* foram lavados com solução salina e incubados com o substrato enzimático ECF, durante alguns segundos, seguida de secagem da membrana em papel de filtro. A revelação foi realizada por um sistema de detecção de *western blotting*, sendo as concentrações expressas em *ratio* entre a eNOS fosforilada e a eNOS total, utilizando o programa informático ImageQuant 5,0.

II.IX. DETERMINAÇÃO DE MARCADOR DE INFLAMAÇÃO

Durante o processo inflamatório que caracteriza o estado vascular na DMT2, ocorre a libertação de diversas citocinas pró-inflamatórias, cujos efeitos contribuem para a marcada disfunção endotelial. Uma dessas citocinas é a monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Para avaliar os seus níveis na estrutura vascular dos ratos estudados marcou-se a MCP-1 usando anticorpo primário (Chemicon, Sintra, Portugal) e anticorpo secundário (Alexa Fluoro 488, Molecular Probes, Barcelona, Espanha) que fluoresce de verde ao ser observada no



microscópio de fluorescência Bio-Rad MRC-600, equipado com laser kriptón/árgon, utilizando um filtro de 485 nm.

II.X. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como valor médio \pm e.p.m. (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism version 3.0 por ANOVA one-way seguida de teste comparativo de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.



III. RESULTADOS

III.I. PESO CORPORAL

No final dos 3 meses de tratamento, com a idade de 15 meses, o peso corporal dos ratos sujeitos a RC foi menor do que o peso dos ratos não sujeitos a esta abordagem ($p < 0,001$) (Tabela I). Verificou-se que a perda de peso foi superior nos ratos Wistar sujeitos a RC do que nos ratos GK sujeitos a RC, 22% e 18,4%, respectivamente (Tabela I).

Tabela I. Peso corporal dos ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC) no final do tratamento.

Diminuição do peso corporal com restrição calórica.

	Wistar	GK	W + RC	GK + RC
Peso Corporal (g)	495 ± 18	351,2 ± 7,4 ***	379 ± 17 ***	287 ± 8,5 φφφ
Diminuição do peso corporal			22%	18,4%

*** $p < 0,001$ vs ratos Wistar; φφφ $p < 0,001$ vs GK



III.II. PARÂMETROS METABÓLICOS

III.II.I. GLICEMIA EM JEJUM

A glicemia em jejum ao fim de 3 meses foi superior nos ratos GK em relação aos ratos Wistar ($p < 0,001$) (Tabela II). Nos ratos sujeitos a restrição calórica não se verificou variação significativa nos valores de glicemia em jejum (Tabela II).

Tabela II. Glicemia em jejum de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC).

	Wistar	GK	W + RC	GK + RC
Glicemia em jejum (mg/dl)	66,1 ± 1,7	91,2 ± 3,5 ***	65,5 ± 1,9	99,2 ± 4,1 ***

*** $p < 0,001$ vs ratos Wistar

III.II.II. PROVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRA-PERITONEAL E HEMOGLOBINA GLICADA (HBA_{1C})

Pela realização desta prova foi possível confirmar a intolerância marcada à glicose nos ratos GK controle e com RC em comparação com os ratos Wistar. Nos ratos GK sujeitos a RC, aos 60 minutos, a glicemia foi significativamente menor comparando com os GK controle ($p < 0,05$). Observou-se uma diminuição dos níveis de glicemia após os 90 minutos nos ratos GK com RC ($p < 0,001$), ao contrário do que aconteceu com os ratos GK controle, cujos níveis de glicemia continuaram a subir (Fig. 2-A).

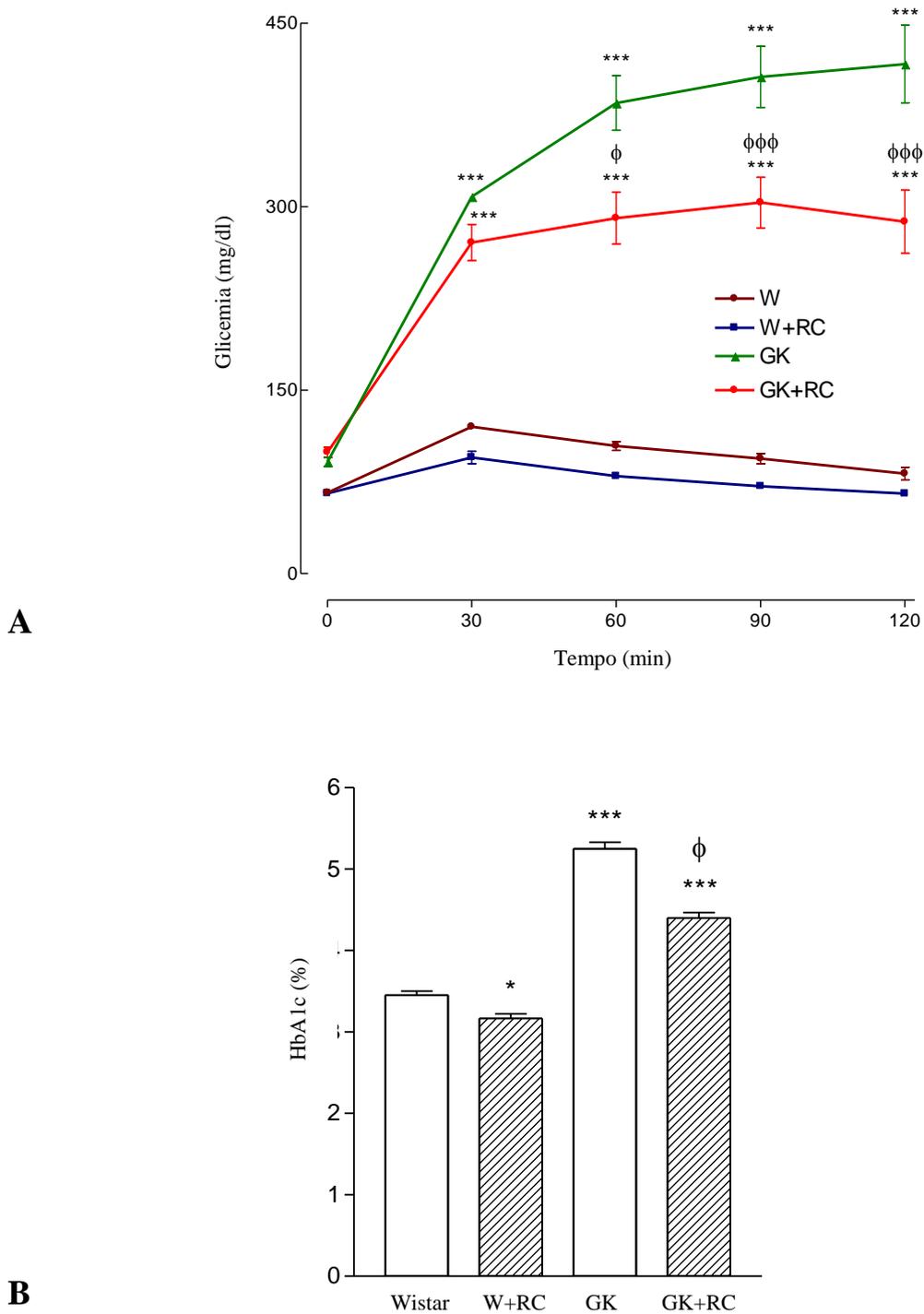


Figura 2. Prova de tolerância à glicose intra-peritoneal (A) e níveis de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) (B) nos ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC) (B).

* p<0,05; *** p<0,001 vs ratos Wistar; φ p<0,05; φφφ p<0,001 vs GK.



Nos ratos Wistar sujeitos a RC também se verificou uma ligeira redução (não significativa) dos níveis de glicemia ao longo da prova, comparando com os ratos Wistar controlo (Fig. 2-A).

No que diz respeito à HbA_{1c}, constatou-se que os ratos GK apresentavam níveis superiores aos ratos Wistar controlo ($p < 0,001$). Ocorreu uma diminuição dos níveis de HbA_{1c} nos ratos Wistar sujeitos a RC ($p < 0,05$) comparativamente aos ratos Wistar controlo e nos ratos GK sujeitos a restrição calórica ($p < 0,05$), comparativamente aos respectivos controlos. (Fig. 2-B).

III.II.III. PERFIL LIPÍDICO

No perfil lipídico realizado estudaram-se os níveis de colesterol total, colesterol não-HDL e triglicéridos.

Os valores de colesterol total nos ratos GK foram superiores aos dos ratos Wistar em ambos os grupos ($p < 0,001$). Os níveis nos ratos Wistar com RC foram superiores aos apresentados pelos ratos Wistar controlo ($p < 0,01$). Verificou-se, ainda, que os valores de colesterol total dos ratos GK com RC foram inferiores aos dos ratos GK controlo ($p < 0,05$) (Fig. 3-A). Simultaneamente, observou-se que o colesterol não-HDL nos ratos Wistar com RC manteve-se constante em relação aos ratos Wistar controlo. (Fig. 3-B). Este mesmo parâmetro, mais elevado nos ratos GK (vs Wistar, $p < 0,01$) foi significativamente inferior nos ratos GK com RC, quando comparado com os ratos GK controlo ($p < 0,01$) (Fig. 3-B).

Nos valores de triglicéridos verificou-se que os ratos GK controlo apresentavam níveis superiores aos ratos Wistar controlo ($p < 0,001$). Nos ratos GK com RC verificou-se uma diminuição bastante acentuada dos níveis de triglicéridos, quando comparados com os ratos GK controlo ($p < 0,001$) (Fig. 3-C).

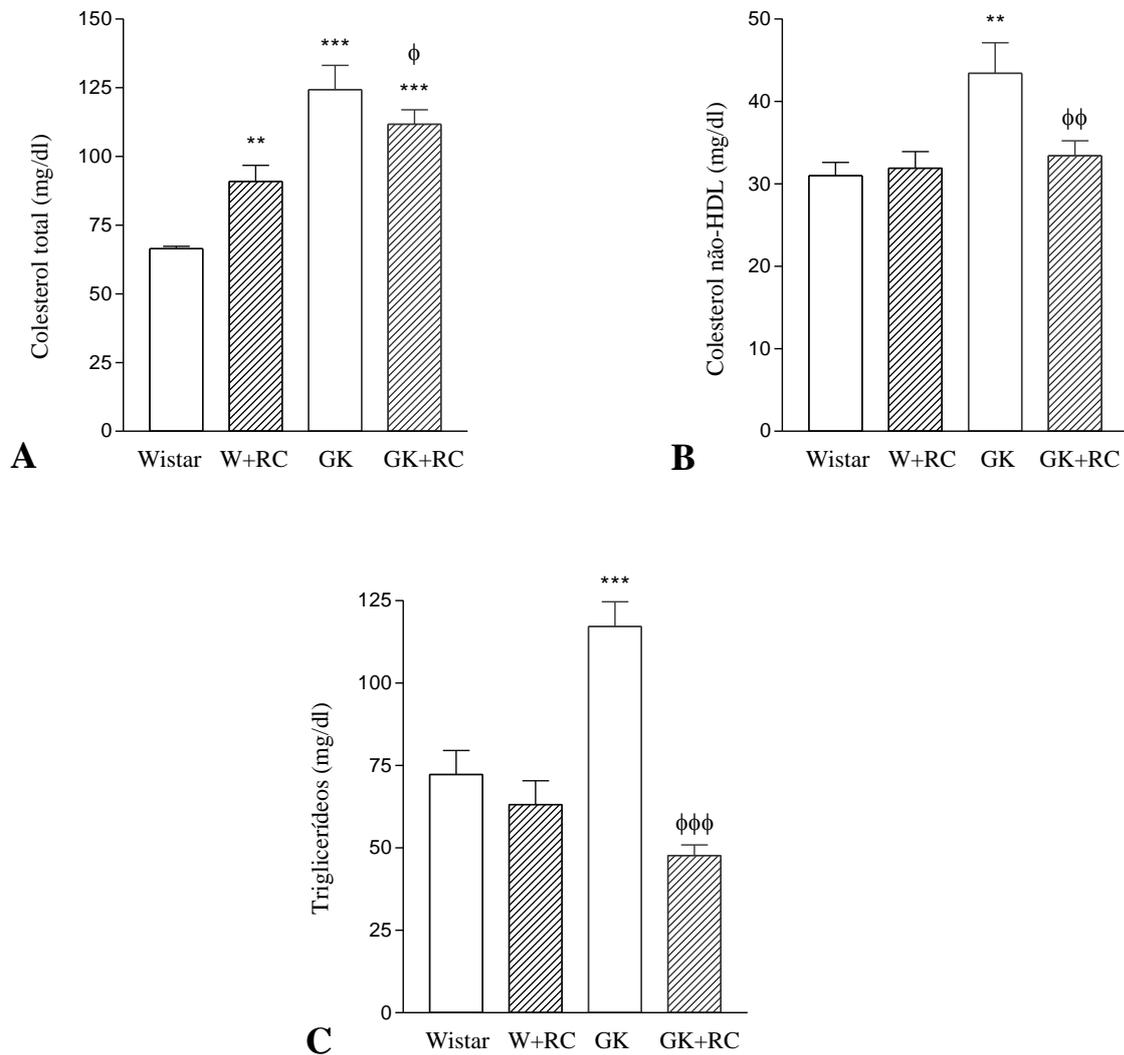


Figura 3. Níveis séricos de colesterol total (A), colesterol não-HDL (B) e triglicerídeos (C) nos ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (W + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC) (C).

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs ratos Wistar; φ $p < 0,05$; φφ $p < 0,01$; φφφ $p < 0,001$ vs GK.



III.III. FUNÇÃO ENDOTELIAL

Ao testar a função endotelial verificou-se que os ratos Wistar apresentavam resposta vasodilatadora mais intensa à administração de acetilcolina em ambos os grupos, comparando com os ratos GK. Verificou-se que a diminuição da contracção vascular após a administração de acetilcolina nos ratos GK sujeitos a RC é aproximadamente 20% inferior à diminuição da contracção verificada nos ratos GK controlo (Fig. 4-A). Nos ratos Wistar não se verificaram variações significativas. (Fig. 4-A).

Ao avaliar a resposta vascular após administração de nitroprussiato, não se observaram diferenças entre os diversos grupos testados (Fig. 4-B).

A eNOS é a responsável pela produção de grande parte do óxido nítrico a nível do endotélio em artérias de grande calibre como a aorta (Sena *et al.*, 2008). Na figura 5 é possível observar um menor *ratio* eNOS_p/eNOS total nos ratos GK comparativamente aos ratos Wistar ($p < 0,001$). Verificou-se, ainda, um aumento do *ratio* nos ratos GK com RC quando comparados com os ratos GK controlo ($p < 0,001$). Inversamente, verificou-se uma diminuição deste *ratio* nos ratos Wistar com RC em relação aos Wistar controlo ($p < 0,001$).

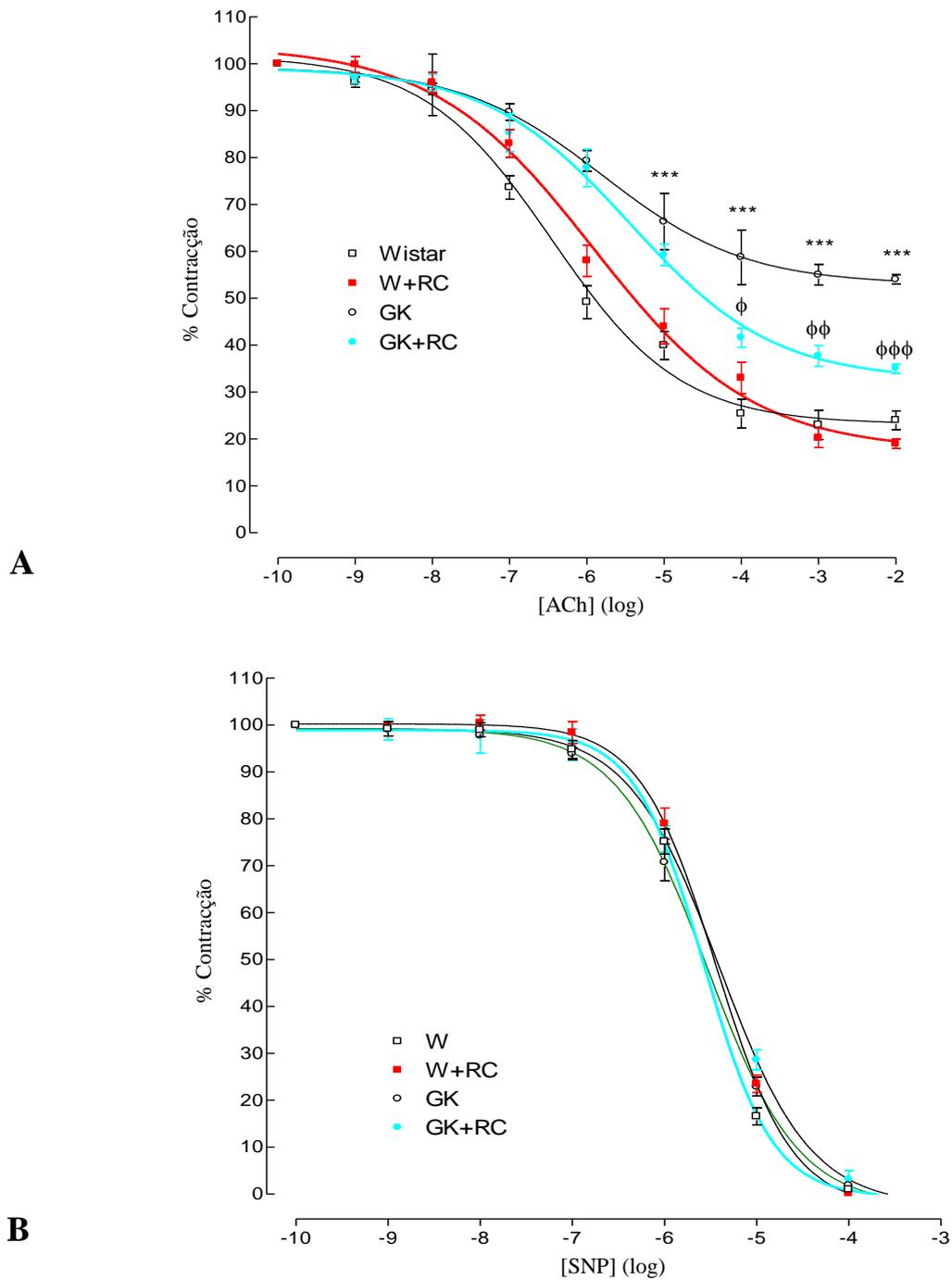


Figura 4. Resposta vasodilatadora da artéria aorta após administração de doses crescentes de acetilcolina (A) e após administração de doses crescentes de nitroprussiato (B).

*** $p < 0,001$ vs ratos Wistar; ϕ $p < 0,05$; $\phi\phi$ $p < 0,01$; $\phi\phi\phi$ $p < 0,001$ vs GK.

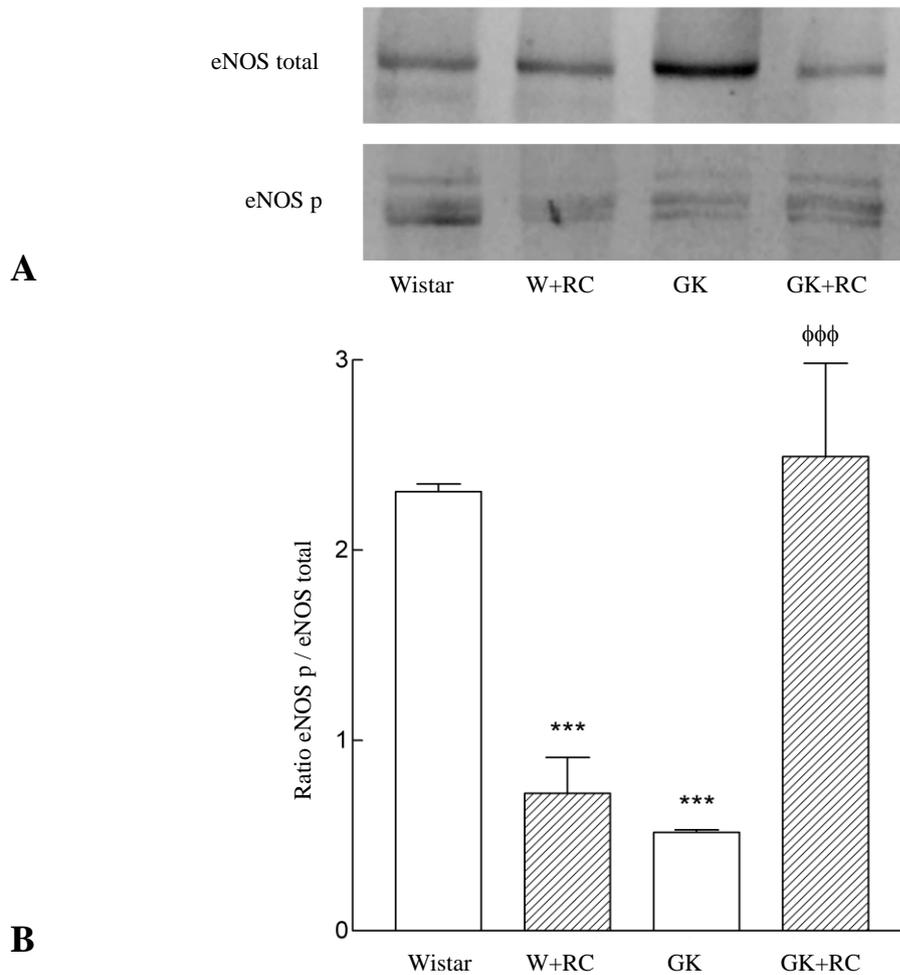


Figura 5. Expressão de óxido nítrico sintetase em tecido aórtico. Análise *Western blot* da expressão de óxido nítrico sintetase fosforilada e total (A) e *ratio* da expressão de óxido nítrico sintetase fosforilada e total, em aorta de ratos Wistar , ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos com restrição calórica (GK + RC) (B).

*** $p < 0,001$ vs ratos Wistar; φφφ $p < 0,001$ vs ratos GK.

III.IV. MARCADORES DE *STRESS* OXIDATIVO

Neste estudo verificou-se que a quantidade de fluorescência emitida após oxidação do dihidroetídeo pelos iões superóxido (O_2^-) presentes na parede vascular foi mais intensa nos ratos GK do que nos ratos Wistar. Nos ratos GK controlo a fluorescência foi superior à dos ratos GK com RC (Fig. 6). Também nos ratos Wistar se verificaram diferenças, sendo que os ratos com RC apresentaram menos fluorescência do que os respectivos controlos (Fig. 6).

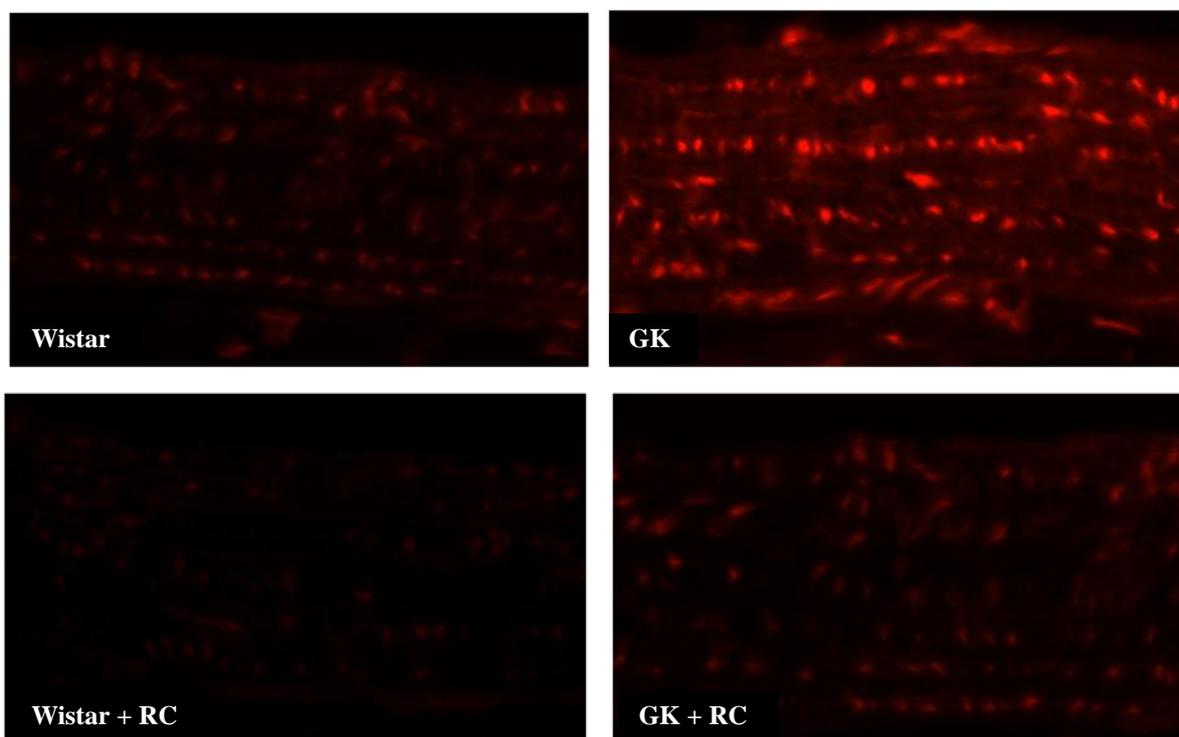


Figura 6. Cortes histológicos da aorta de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC), observados em microscópio de fluorescência a um comprimento de onda de 568 nm. Emissão de Brometo de Etídeo formado através da reacção do Dihidroetídeo com os iões superóxido.

A nitrotirosina é um produto estável do peroxinitrito; deste modo funciona como marcador da sua produção e também da presença de iões superóxido na parede vascular. Verificou-se uma maior fluorescência nos ratos GK controlo do que nos Wistar controlo e

menor fluorescência nas amostras de ratos GK com RC do que nas de ratos GK controlo (Fig.7). Também foi possível observar uma discreta diminuição da fluorescência nas amostras dos ratos Wistar com RC quando comparados com os Wistar controlo (Fig.7).

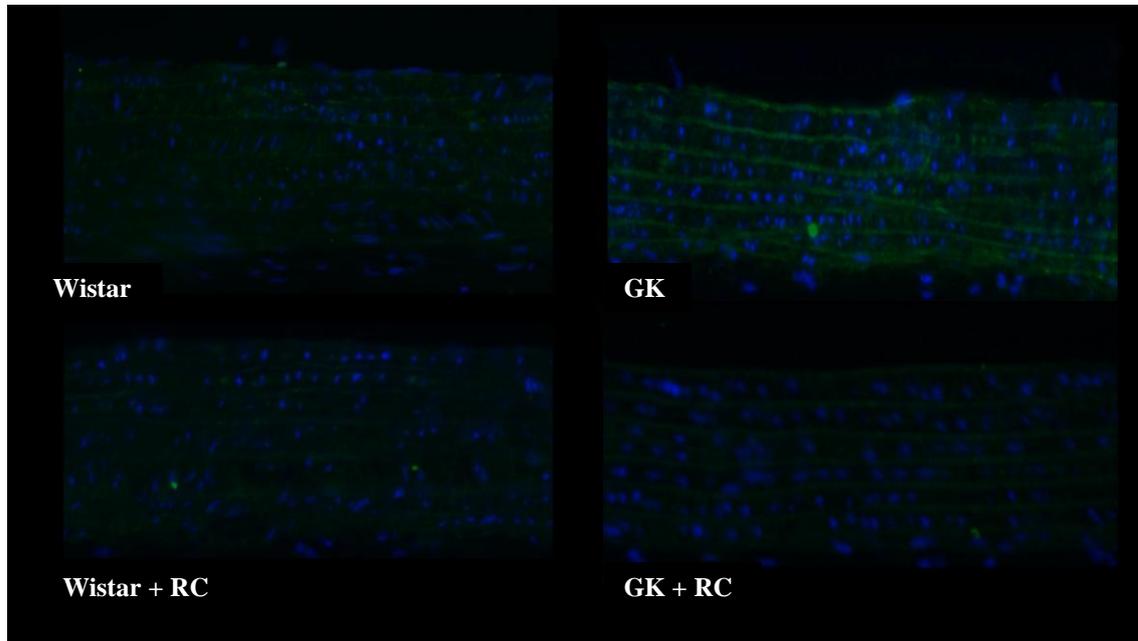


Figura 7. Cortes histológicos da aorta de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC), observados em microscópio de fluorescência a um comprimento de onda de 485 nm. Marcação com anticorpo anti-nitrotirosina.

III.V. MARCADOR DE INFLAMAÇÃO

Ao utilizar um anticorpo específico para a MCP-1 e um anticorpo fluorescente secundário anti-coelho, verificou-se que os ratos GK apresentavam maior fluorescência que os ratos Wistar em ambos os grupos. Nos ratos GK sujeitos a tratamento com RC, a fluorescência verde foi muito menor que nos ratos GK controlo (Fig.8). Nos ratos Wistar com RC também se verificou uma ligeira diminuição da fluorescência comparativamente aos ratos Wistar controlo (Fig.8).

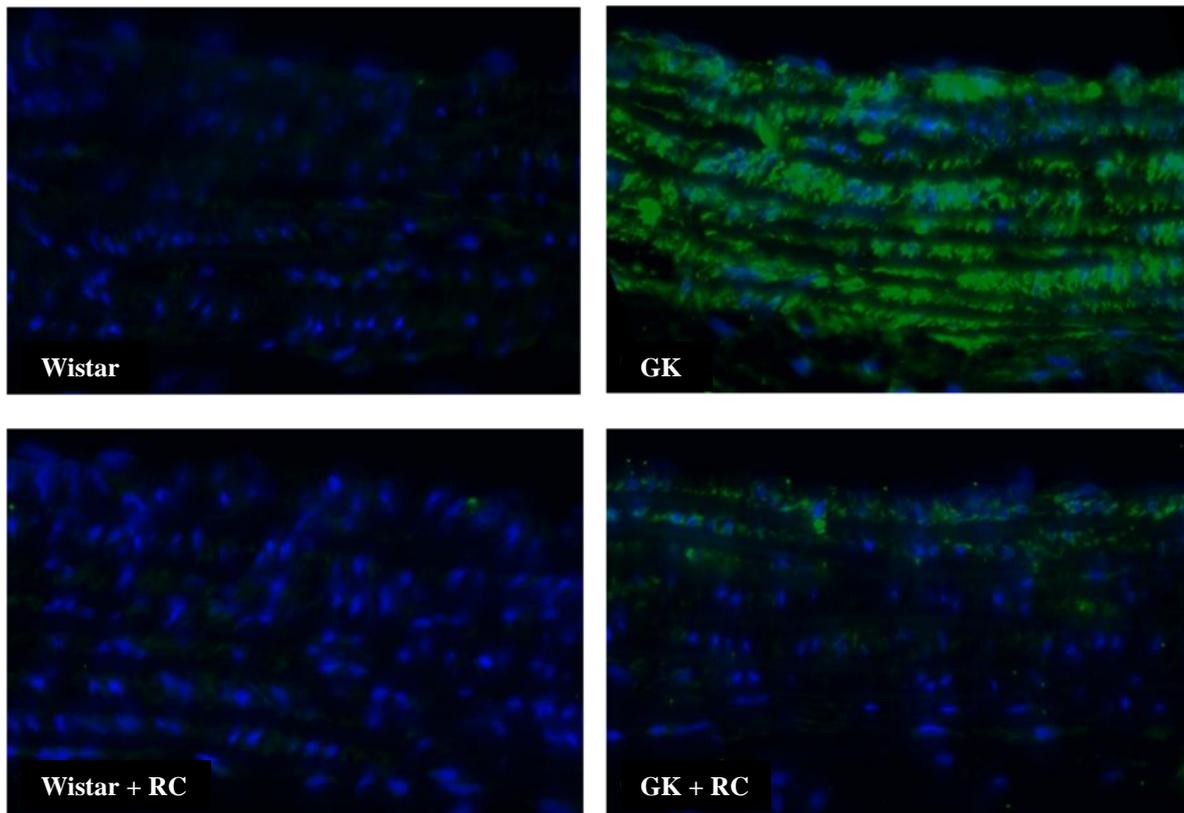


Figura 8. Cortes histológicos da aorta de ratos Wistar, ratos GK, ratos Wistar com restrição calórica (Wistar + RC) e ratos GK com restrição calórica (GK + RC), observados em microscópio de fluorescência a um comprimento de onda de 485 nm. Anticorpo anti-MCP-1.



IV. DISCUSSÃO

Neste estudo o regime de restrição calórica em ratos GK traduziu-se por alterações muito significativas nos parâmetros metabólicos, na função endotelial e no estado oxidativo e inflamatório.

Os ratos GK são modelos animais espontaneamente diabéticos tipo 2, não obesos, que apresentam um estado de hiperglicemia crónica com hiperinsulinemia em jejum e insulino-resistência. Foi demonstrado anteriormente que estes animais apresentam disfunção endotelial aos 4 meses de idade (Cheng *et al.*, 2001). A evidência de que a diabetes mellitus contribui para a disfunção endotelial e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas através de mecanismos pró-inflamatórios, oxidativos, pró-ateroscleróticos e outros, foi apresentada anteriormente em diversos trabalhos (Reis *et al.*, 2000; De Vriese *et al.*, 2000; Alwi Shahab, 2006; Esper RJ *et al.*, 2006; Tabit CE *et al.*, 2010;).

A diabetes mellitus conduz a uma instabilidade entre acção oxidante e antioxidante, favorecendo o lado oxidativo (Paolisso G *et al.*, 1999; Szabo C, 2009; Chang C *et al.*, 2010;). Isto pode ser avaliado através de marcadores de *stress* oxidativo como o ião superóxido (O_2^-) e a nitrotirosina. Os iões superóxido reagem com o NO a nível endotelial, inactivando-o e produzindo peroxinitrito (Cai and Harrison, 2000; Zou *et al.*, 2002; Molnar *et al.*, 2005;). O peroxinitrito conduz à oxidação da eNOS, inactivando-a (d'Uscio LV *et al.*, 2003). Desta forma, o anião superóxido conduz a uma menor biodisponibilidade de NO com consequente diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio (Bahia L *et al.*, 2006). Igualmente reconhecido é o estado pró-inflamatório existente na diabetes mellitus. A detecção da MCP-1 permite demonstrar inflamação exuberante nas amostras de animais diabéticos (Esper RJ *et al.*, 2006).



Diversos estudos apresentam a diminuição de peso corporal como uma das consequências da RC (Walford RL *et al.*, 1992; Heilbronn LK *et al.*, 2003; Morinaga H *et al.*, 2009). No nosso trabalho verificámos esta diminuição de peso nos ratos sujeitos a RC, sendo mais acentuada nos ratos Wistar (22%) que nos ratos GK (18,4%).

A hiperglicemia característica da diabetes mellitus foi observada ao longo do nosso estudo. Os ratos GK apresentaram, de modo constante, glicemia em jejum e após administração intra-peritoneal de glicose e níveis de hemoglobina glicada superiores aos ratos Wistar, traduzindo o seu estado de hiperglicemia crónica. Na prova de tolerância à glicose intra-peritoneal foi possível demonstrar que os ratos Wistar com e sem RC apresentavam uma resposta adequada, revelando sensibilidade à insulina e secreção apropriada da hormona em resposta ao estímulo glicémico. Já nos ratos GK verificou-se uma resposta inadequada à glicose (intolerância marcada). Os ratos GK com RC mostraram aos 90 minutos após administração intra-peritoneal de glicose um início de redução dos níveis de glicemia. Tal não aconteceu nos ratos GK controlo onde a partir dos 90 minutos os níveis de glicemia continuaram a aumentar. Esta resposta poderá revelar a capacidade da RC em aumentar a sensibilidade à insulina, como se tem vindo a explorar (Bordone L & Guarente L, 2005; Fontana L & Klein S 2007). À semelhança de outros trabalhos (Dhabbi JM *et al.*, 2001) a hemoglobina glicada revelou-se inferior nos ratos sujeitos a RC, especialmente nos ratos GK, traduzindo um efeito contínuo e duradouro da diminuição dos níveis sanguíneos de glicose.

O perfil lipídico após a RC revelou uma diminuição do colesterol total e não-HDL e dos triglicérides nos ratos GK, reflectindo uma melhoria significativa do estado lipídico, à semelhança de outros trabalhos (Walford RL *et al.*, 1992; Heilbronn LK *et al.*, 2003). Resultados concordantes, neste modelo animal, foram obtidos com substâncias de capacidade anti-oxidante como o ácido α -lipóico e o óleo de soja (Sena CM *et al.*, 2007, Sena CM *et al.*,



2008). Igualmente interessante foi o aumento do colesterol total nos ratos Wistar acompanhado de uma manutenção dos níveis de colesterol não-HDL. Este resultado pode ser interpretado como um aumento do colesterol total à custa do aumento do colesterol HDL, já que o não-HDL permaneceu praticamente inalterável.

A disfunção endotelial associada à diabetes mellitus é alvo de investigação exaustiva e as conclusões culminam na interação complexa de diversos agentes, como hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, endotelina-1, angiotensina II e *stress* oxidativo, que causam múltiplas lesões endoteliais, favorecendo o processo de envelhecimento arterial com desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (De Vriese *et al.*, 2000; Ding H & triggle CR, 2005; Esper RJ *et al.*, 2006; Tabit CE *et al.*, 2010). Sabe-se, também, que os níveis elevados de produtos finais de glicação avançada (AGEs), verificados na diabetes mellitus, reduzem a biodisponibilidade e actividade do NO derivado do endotélio (Goldin A *et al.*, 2006). De facto, doentes diabéticos tipo 2 apresentam níveis de AGEs mais elevados que os indivíduos saudáveis (Kilhovd *et al.*, 2003) e o aumento da concentração de AGEs no soro de indivíduos diabéticos encontra-se associado à disfunção endotelial, independentemente de outros factores de risco (Chow W *et al.*, 2002).

No nosso trabalho, verificou-se uma diminuição da capacidade de vasodilatação dependente do endotélio nos ratos diabéticos GK, traduzindo as consequências dos mecanismos referidos anteriormente e acompanhando estudos anteriores (Escandon CJ & Cipolla M, 2001; Tabit CE *et al.*, 2010). A RC revelou forte capacidade para reverter este défice de vasodilatação dependente do endotélio nos ratos GK, resultados concordantes com os obtidos em ratos obesos diabéticos Otsuka Long Evans Tokushima e ratos envelhecidos C57BL/6NIA (Minamiyama Y., *et al* 2007; Kevin J *et al.*, 2008).



Ao avaliar a resposta vascular após administração de nitroprussiato, não se observaram diferenças entre os diversos grupos testados, reforçando a hipótese de défice de biodisponibilidade do NO como causa preponderante da disfunção vascular.

Outra abordagem usada para a avaliação da função endotelial foi o *ratio* eNOSp/eNOS total. O *ratio* menor nos ratos GK controlo comparativamente aos Wistar controlo traduz uma menor actividade da eNOS nos ratos diabéticos, resultante da sua inactivação por alterações no equilíbrio oxidativo, como referido anteriormente. Este resultado vem complementar outros trabalhos que sugeriam este impacto na função endotelial (Minamiyama Y., *et al* 2007; Zanettia M., *et al* 2010). O aumento do *ratio* eNOSp/eNOS total obtido com a RC nos ratos GK poderá revelar a sua capacidade de equilibrar o ambiente oxidativo na diabetes mellitus, diminuindo níveis de *stress* oxidativo, como verificado neste trabalho relativamente ao ião superóxido. Algumas substâncias que têm sido estudadas como miméticas da RC conseguiram este efeito de aumentar os níveis de eNOS, como é o caso do resveratol (Kevin J *et al.*, 2008; Zhang H., *et al* 2009), ou ainda da curcumina e flavangenol (Rungseesantivanon S., *et al* 2010; Ohkita M., *et al* 2011, respectivamente). Nos ratos Wistar a RC revelou uma diminuição do *ratio*, traduzindo menor actividade de eNOS, podendo expressar uma agressão ao normal equilíbrio vascular.

Os níveis elevados de ião superóxido reflectem uma maior inactivação do NO com consequente disfunção endotelial. Neste trabalho, demonstrou-se a presença de níveis elevados de marcadores de *stress* oxidativo nos ratos diabéticos e a sua diminuição após o período de RC em ratos Wistar e GK, mas mais significativamente nestes últimos. A diminuição do superóxido com a RC também foi observada em trabalhos experimentais com macacos (Fontana L & Klein S 2007). A diminuição do *stress* oxidativo associada à RC foi, também, anteriormente demonstrada com menor produção de peróxido de hidrogénio (H₂O₂)



(Castello L., *et al* 2005). A expressão elevada de nitrotirosina na parede vascular de ratos diabéticos traduz a produção elevada de peroxinitrito, responsável pela inativação da eNOS, e produção elevada de iões superóxido. A RC induziu uma diminuição dos níveis de nitrotirosina nos ratos GK e Wistar, mas mais acentuada nos ratos GK, resultados que vão ao encontro dos obtidos em estudos com ratos obesos diabéticos Otsuka Long Evans Tokushima (Minamiyama Y., *et al* 2007).

Na diabetes mellitus existe um estado pró-inflamatório acentuado (Sena *et al.*, 2008; Packard R & Libby P., *et al* 2008). No nosso trabalho, demonstrámos a participação da MCP-1 neste processo inflamatório. Verificou-se elevada expressão na parede arterial de ratos diabéticos com diminuição bastante acentuada nos ratos diabéticos sujeitos a RC. Este resultado acrescenta evidência a outros estudos onde se verificaram níveis elevados de marcadores inflamatórios como o TNF- α e as interleucinas IL-6 e IL-1 β em ratos diabéticos e diminuição da sua expressão após período de RC (Esper RJ *et al.*, 2006; Kevin J *et al.*, 2008; Zhang H., *et al* 2009; Tabit CE *et al.*, 2010;).

O estudo da RC em humanos encontra-se limitado por razões éticas óbvias. No entanto, em alguns trabalhos epidemiológicos foi possível observar alguns dos efeitos da RC. Os trabalhos de Fontana L & Klein S (2007) e de Holloszy J & Fontana L (2008) revelam um decréscimo de doença coronária nos países envolvidos na segunda guerra mundial que sofreram longos períodos de baixo abastecimento alimentar e um aumento dos casos após terminar a guerra. Os habitantes da ilha de Okinawa, que têm uma dieta com menos 30% de calorias que os restantes habitantes do Japão, apresentam menos 35% de casos de doença cardiovascular e cancro. Esta população é, também, a que tem mais centenários em todo o Mundo. Contudo, estas associações não apresentam causalidade entre a RC e o aumento da sobrevida.



Apesar destes efeitos benéficos é preciso salientar que diversos trabalhos têm evidenciado efeitos prejudiciais no ser humano, tais como anemia, depressão, atrofia muscular e diminuição da densidade óssea (Fontana L & Klein S, 2007). É difícil determinar com segurança uma percentagem de RC em cada pessoa, devido à influência de diversos factores como a composição corporal inicial, gasto diário de energia e outros. Além disso, é possível que a RC beneficie uns sistemas, como o cardiovascular, e prejudique outros. Deste modo, poder-se-á explorar as vias de acção da RC na melhoria do estado metabólico e oxidativo, e a sua influência no sistema cardiovascular. Esse conhecimento poderá ser usado para investigar alternativas que sejam específicas para os alvos de acção da RC sem prejudicar outros órgãos e sistemas.



V. CONCLUSÕES

O nosso trabalho demonstrou que a diabetes mellitus tipo 2 associada ao envelhecimento envolve um marcado desequilíbrio metabólico e uma significativa disfunção endotelial, que se traduz por uma reduzida capacidade de vasodilatação dependente do endotélio, sendo um factor predisponente às complicações macro e micro-vasculares. Esta disfunção associa-se a uma menor actividade da óxido nítrico sintetase endotelial e a uma elevada expressão de marcadores de *stress* oxidativo, como o anião superóxido e a nitrotirosina, que aparentemente conduzem a uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico. A restrição calórica melhora a capacidade vasodilatadora do endotélio, diminui os níveis de *stress* oxidativo e atenua o processo inflamatório associado.

A restrição calórica revela-se um possível recurso na terapêutica da diabetes mellitus a par de outras medidas não farmacológicas e farmacológicas, bem como uma base de desenvolvimento para novos meios terapêuticos. Tem sido alvo de estudo por diversos grupos de trabalho e o nosso estudo revela-se um importante contributo na demonstração da evidência dos efeitos benéficos desta abordagem.



VI. REFERÊNCIAS

Alwi Shahab, 2006 – Alwi Shahab (2006). Why Does Diabetes Mellitus Increase The Risk of Cardiovascular Disease? *J. Intern. Med.* **38**: 40-51.

Bahia L *et al.*, 2006 – Bahia L, Aguiar LG, Villela N, Bottino D, Bouskela E (2006). The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **50**:291-303.

Bordone L & Guarente L, 2005 - Bordone L & Guarente L (2005). Calorie restriction, SIRT 1 and metabolism: Understanding longevity. *Nature* **6**:298-305.

Brownlee M, 2001 - Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications (2001). *Nature* **414**:813–820.

Cai and Harrison, 2000 – Cai H, Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* **87**:840-844.

Castello L., *et al* 2005 – Castello L, Froio T, Cavallini G, Biasi F, Sapino A, Leonarduzzi G, Bergamini E, *et al* (2005). Calorie restriction protects against age-related rat aorta sclerosis. *The FASEB journal* **19**:1863-1865.

Chang C *et al.*, 2010 - Chang C, Chuang L (2010). The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am. J. Transl. Res.* **2**:316-331.



Cheng *et al.*, 2001 – Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H e tal. (2001). Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension* **37**: 433-439.

Chow W et al., 2002 - Chow, Ai v, Metz c, Bucalar, Lamk (2002). Advanced Glycation End Products and Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **25**:1055–1059.

De Vriese *et al.*, 2000 – de Vriese AS, Verbeuren TJ, van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000). Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* **130**:930-974.

Dhabbi, JM *et al.*, 2001 - Dhabbi, JM *et al* (2001). Caloric restriction alters the feeding response of key metabolic enzymes genes. *Mech. Ageing Dev.* **122**:1033-1048.

Ding H & triggle CR, 2005 - Ding H & triggle CR (2005). Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type 2 diabetes: assessing the health of the endothelium. *Vascular Health and Risk Management.* **1**:55–71.

d'Uscio LV *et al.*, 2003 – d'Uscio LV, Milstien S, Richardson D (2003). Long term vitamin C treatment increases vascular tetrahydrobiopterin levels and nitric oxide synthase activity. *Cir. Res.* **92**:88-95.

Escandon CJ & Cipolla M, 2001 - Escandon CJ & Cipolla M (2001). Diabetes and endothelial dysfunction: A clinical Perspective. *Endocr. Rev.* **22**:36-5.



Esper RJ *et al.*, 2006 – Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. (2006). Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology* **5**:4-26.

Fontana L & Klein S 2007 - Fontana L & Klein S (2007). Aging, Adiposity, and Calorie Restriction. *JAMA* **297**:986-992.

Goldin A *et al.*, 2006 – Goldin A, Beckam JÁ, Schmidt AM, Creager MA (2006). Advanced Glycation End Products – Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* **114**:597-605.

Hadi AR & Suwaidi AL, 2007 - Hadi AR & Suwaidi AL (2007). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular Health and Risk Management* **3**(6): 853–876.

Heilbronn LK *et al.*, 2003 – Heilbronn LK, Ravussin E (2003). Calorie restriction and aging: Review of the literature and implications for studies in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**:361-369.

Holloszy J & Fontana L 2008 – Holloszy J & Fontana L (2008). Caloric Restriction in Humans. *Exp Gerontol.* **42**(8):709–712.

Hsueh WA & LAW RE, 1998 – Cardiovascular risk continuum: Implications of insulin resistance end diabetes. *Am. J. Med.* **105**: 4S-14S.



Hu FB *et al.*, 2001 - Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willett WC. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* **345**:790-7.

Jakus V & Rietbrock N, 2003 – Jakus V & Rietbrock N (2003). Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol. Res.* **53**: 131-142.

Kevin J *et al.*, 2008 - Kevin J, Joseph A, Kaitlyn N, Peshkin L, Nathan L, Labinsky N *et al.*, (2008). Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending lifespan. *Cell Metab.* **8**:157–168.

Kilhovd *et al.*, 2003 – Kilhovd BK, Giardino I, Torjesen PA, Birkeland KI, Berg TJ, Thornalley PJ *et al* (2003). Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* **52**:163-167.

Knowler WC *et al.*, 2002 - Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* **46**: 393-403.

Minamiyama Y., *et al* 2007 - Minamiyama Y, Bito Y, Takemura S, Takahashi Y, Kodai S, Mizuguchi S *et al.*, (2007). Calorie Restriction Improves Cardiovascular Risk



Factors via Reduction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Type II Diabetic *Rats*
JPET **320**:535–543.

Molnar *et al.*, 2005 – Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshev I, Dansky HM (2005). Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J. *Circ. Res.* **96**:1178-1184.

Morinaga H *et al.*, 2009 – Morinaga H, Ohta T, Matsui K, Sasase T, Fukuda S, Ito M, Ueda M, Ishii Y, Miyajima K, Matsushita M (2009). Effect of Food Restriction on Adipose Tissue in Spontaneously Diabetic Torii Fatty Rats. *Experimental Diabetes Research.* **10**: 10-19.

Ohkita M., *et al* 2011 - Ohkita M, Kiso Y, Matsumura Y (2011). Pharmacology in Health Foods: Improvement of Vascular Endothelial Function by French Maritime Pine Bark Extract (Flavanganol). *Journal of Pharmacological Sciences* **1**: 1-5.

OND, 2010 - Observatório Nacional da Diabetes (2010). Diabetes: Factos e números. Relatório Anual sobre a Diabetes. Sociedade Portuguesa de Diabetologia.

Packard R & Libby P., *et al* 2008 - Packard R & Libby P (2008). Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clinical Chemistry* **54**:24-38.



Paolisso G *et al.*, 1999 – Paolisso G, Esposito R, D'Alessio MA, Barbieri M (1999). Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab.* **25**: 298-306.

Quehenberger P *et al.*, 2000 – Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M *et al.* (2000). Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor- κ B in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* **49** (9):1561-1570.

Reis *et al.*, 2000 – Reis ED, Roque M, Dansky H, Fallon JT, Badimon JJ, Cordon-Cardo C (2000). Sulindac inhibits neointimal formation after arterial injury in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12764-12769.

Rungseesantivanon S., *et al* 2010 - Rungseesantivanon S, Thenchaisri N, Ruangvejvorachai P, Patumraj S (2010). Curcumin supplementation could improve diabetes-induced endothelial dysfunction associated with decreased vascular superoxide production and PKC inhibition. *Complementary and Alternative Medicine* **10**:57-66.

Saltiel, 2001 - Saltiel AR (2001). New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* **104**:517-29.

Schalkwijk CG & Stehouwer CDA, 2005 – Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin. Sci.* **109**:143-159.



Sena CM *et al.*, 2007 – Sena CM, Nunes E, Louro T, Proença T, Seíça RM (2007). Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes: Effect of Antioxidants. *Rev Port Cardiol.* **26**: 609-619.

Sena CM *et al.*, 2008 – Sena CM, Nunes E, Louro T, Proença T, Fernandes R, Seíça RM (2008). Effects of α -lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats. *British Journal of Pharmacology.* **153**:894-906.

Szabo C, 2009 – Szabo C (2009). Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *British Journal of Pharmacology* **156**:713 – 727.

Tabit CE *et al.*, 2010 - Tabit CE, Hamburg NM, Vita J. (2010) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **11**: 61– 74.

Walford RL *et al.*, 1992 – Walford RL, Harris SB, Gunion MW (1992). The calorically restricted low-fat nutrient-dense diet in Biosphere 2 significantly lowers blood glucose, total leukocyte count, cholesterol, and blood pressure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:11533-11537.

Widlansky ME *et al.*, 2003 - Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JÁ (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* **42**:1149 –1160.

Zanettia M *et al.*, 2010 - Zanettia M, Gortan G, Burekovic I, Barazzonia R, Stebelb M, Guarnieria G (2010). Caloric restriction improves endothelial dysfunction during vascular



aging: Effects on nitric oxide synthase isoforms and oxidative stress in rat aorta. *Experimental Gerontology* **45**: 848-855.

Zhang H., *et al* 2009 - Zhang H, Zhang J, Ungvari Z, Zhang C (2009). Resveratrol Improves Endothelial Function: Role of TNF α and Vascular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**:1164-1171.

Zimmet P *et al.*, 2001 - Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**:782-7.

Zou *et al*, 2002 – Zou MH, Shi C, Cohen RA (2002). Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* **109**:817-826.