

Instituto Politécnico do Porto

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Centro de Farmacologia e Biopatologia Química (U38-FCT), Serviço de Bioquímica -
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Linfangiogénese no tecido adiposo em modelos de doença inflamatória crónica (asma e obesidade): uma abordagem por imunohistoquímica e lipidómica

Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde

Joana Filipa Correia de Almeida

Vila Nova de Gaia, Setembro de 2011

Instituto Politécnico do Porto

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Centro de Farmacologia e Biopatologia Química, Serviço de Bioquímica - Faculdade de
Medicina da Universidade do Porto

Linfangiogénese no tecido adiposo em modelos de doença inflamatória crónica (asma e obesidade): uma abordagem por imunohistoquímica e lipidómica

Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde

Joana Filipa Correia de Almeida

Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde, sob orientação da Professora
Doutora Raquel Soares, e co-orientação do Professor Doutor Rúben Fernandes

Vila Nova de Gaia, Setembro de 2011

Agradecimentos

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, em especial a Área Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas pelo acolhimento e suporte financeiro.

À Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e ao Centro de Farmacologia e Biopatologia Química por me terem acolhido e apoiado na execução deste projecto.

À Professora Doutora Raquel Soares por toda a disponibilidade, simpatia, orientação científica, apoio e palavras encorajadoras, apesar da sua agenda “pouco permissiva”, um enorme e sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Rúben Fernandes por todo o tempo dispensado, por todo o apoio em todos os momentos, bons e menos bons que caracterizaram este projecto, orientação e simpatia incondicionais, a minha gratidão.

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, o meu sincero agradecimento pelo apoio e incentivo permanentes, pela transmissão de conhecimentos, e pelo exemplo de perseverança em alcançar os seus objectivos.

Aos meus colegas de trabalho na Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto por todo o companheirismo e carinho revelados ao longo deste ano e meio, bem como pelo espírito de alegria no gabinete, laboratório ou corredores da “escolinha”, muito obrigada.

Aos meus colegas de laboratório no Serviço de Bioquímica do Centro de Farmacologia e Biopatologia Química da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, o meu agradecimento por todo o apoio científico e laboratorial na execução de procedimentos indispensáveis à concretização deste projecto.

À Doutora Bárbara Macedo e Dr. Rui Fernandes do Instituto de Biologia Molecular e Celular da Universidade do Porto pela disponibilidade, apoio e conhecimento científico transmitido, os quais contribuíram para a concretização e enriquecimento deste trabalho.

A todos os meus colegas do Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde pelas tardes, noites e fins-de-semana partilhados, pelos momentos de diversão e desespero que para sempre ficarão na memória, pela partilha de conhecimento tão vasto e representativo da heterogeneidade do grupo, mas que resultou na união de todos...obrigada e sucesso para o futuro.

O meu profundo agradecimento a todos os meus Amigos por terem sido passados para segundo e terceiro planos, por verem muitos convites recusados e, ainda assim, revelarem apoio e compreensão incondicionais...pela atenção dispensada nos momentos de “drama e tragédia” e de questões (in)existenciais, e pelos momentos de imensa alegria e boa-disposição...sem vós não seria possível!

A todos os que, ao longo desta viagem, de forma mais permanente, ou de passagem, demonstraram o seu apoio com palavras e vivências, obrigada.

O meu maior e sincero agradecimento aos meus pais, à minha irmã e ao Carlos pela maravilhosa e compreensiva família que são, por me permitirem concretizar mais uma fase da minha vida, e encorajarem-me a ser mais e melhor a cada pequeno passo...

Resumo/Abstract

O tecido adiposo é um órgão endócrino dinâmico, secretando factores importantes na regulação do metabolismo, fluxo vascular sanguíneo e linfático, e função imunológica, entre outros. Em caso de acumulação de tecido adiposo por ingestão de uma dieta gorda, ou por disfunção metabólica, os adipócitos podem desencadear uma reacção inflamatória por falha na drenagem linfática, acumulando-se mediadores inflamatórios, os quais potenciam a propagação da reacção. Assim, questiona-se uma potencial associação entre o aumento de tecido adiposo na obesidade, hipóxia adipocitária e estimulação da linfangiogénese. Além disso, a expressão de adipocinas varia de acordo com a distribuição do tecido adiposo (subcutâneo, TAS e visceral, TAV). Deste modo, pretende-se com este estudo contribuir para o aumento do conhecimento sobre os complexos mecanismos moleculares subjacentes à linfangiogénese. Ensaios com ratinhos da estirpe C57Bl/6J (modelo de obesidade) e BALB/c (modelo de asma e obesidade), divididos em grupos submetidos a dieta normal e dieta rica em gordura. Avaliação semi-quantitativa da expressão tecidual de LYVE-1 (marcador da linfangiogénese) por imunohistoquímica em material embebido em parafina, no TAS e TAV, e cromatografia líquida de ultra-performance acoplada de espectrometria de massa (UPLC-MS) para análise da expressão plasmática de ceramida e esfingosina-1-fosfato (S1P). No modelo de obesidade observou-se diminuição do número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 ao longo do tempo no TAV, e aumento de ambos os parâmetros e hipertrofia adipocitária no TAS. As concentrações de ceramida e S1P corroboram a existência de um processo inflamatório nos ratinhos em estudo, ainda que numa fase muito inicial. No modelo de asma e obesidade, após 17 semanas de tratamento, observou-se incremento da linfangiogénese no TAV, mas não no TAS. A resposta inflamatória avaliada através dos diferentes parâmetros permite afirmar que num estadio inicial de obesidade a proliferação linfática poderá estar a ser retardada pela hipertrofia adipocitária. A libertação de adipocinas será observada apenas numa fase posterior, desencadeando todo o processo inflamatório que incrementará a proliferação linfática. Adicionalmente, é possível sugerir que a maior pressão à qual o TAV se encontra sujeito não favorece a proliferação linfática, pelo menos num estadio inicial.

Palavras-chave: Asma, linfangiogénese, LYVE-1, PROX-1, tecido adiposo, VEGF.

Adipose tissue is an endocrine and dynamic organ which secretes important factors in metabolism, blood and lymphatic vascular flow, and immune function, among many other functions. In case of adipose tissue accumulation due to a high fat diet or metabolic dysfunction, adipocytes may initiate an inflammatory reaction for lymphatic drainage failure, accumulating inflammatory mediators, which may spread the inflammatory reaction. Consequently, this raises questions in order to a potential association between adipose tissue increasing in obesity, adipose hypoxia and lymphangiogenesis stimulation. Furthermore, expression of adipokines varies according to adipose tissue distribution (subcutaneous, SAT and visceral, VAT). This contributes to an impaired molecular heterogeneity, however there's a lot remaining unknown. So, we pretend to contribute to disclose the complex molecular mechanisms underlying lymphangiogenesis. Lab animals experiments using C57Bl/6J (obesity model) and BALB/c (obesity and asthma model), divided into normal diet and high fat diet groups. Semi-quantitative evaluation of LYVE-1 tissue expression by immunohistochemistry in formalin-fixed and paraffin embedded tissue sections, in SAT and VAT, and Ultra Performance Liquid Chromatography plus Mass Spectrometry for ceramide and sphingosine-1-phosphate (S1P) plasma expression analysis. In obesity model, it was observed a reduction in the number of lymphatic vessels and LYVE-1 expression over time in VAT, and both parameters increasing in SAT, plus adipose hypertrophy. The concentrations of ceramide and S1P corroborate the existence of an inflammatory process in mice under study, though a very early stage. In obesity and asthma model, it was observed an increment in lymphangiogenesis in VAT, but not in SAT, after 17 weeks of treatment. Inflammatory response assessed by the different parameters in study allows the statement that in an early obesity stage, lymphatic proliferation is likely to be delayed by adipocyte hypertrophy. The release of adipokines is observed only at a later stage, triggering the entire inflammatory process that will increase lymphatic proliferation. Furthermore, it is plausible to suggest that the utmost pressure to which the VAT is subjected does not favor lymphatic proliferation, at least in an initial stage.

Keywords: Asthma, adipose tissue, lymphangiogenesis, LYVE-1, PROX-1, VEGF.

Índice

Capítulo I: Introdução.....	1
1.1. O sistema linfático, o tecido adiposo e a obesidade.....	2
1.2. O modelo da doença inflamatória crónica (asma) e a obesidade.....	5
1.3. Factores de transcrição e diferentes vias de sinalização envolvidas no processo linfangiogénico	7
1.3.1. PROX-1, VEGFR-3 e os seus ligandos VEGF-C e VEGF-D e LYVE-1	7
1.3.2. Esfingolípidos e linfangiogénese: Ceramida e Esfingosina-1-Fosfato.....	10
Capítulo II: Material e Métodos	16
2.1. Amostra.....	17
2.2. Métodos	17
2.2.1. Imunohistoquímica	17
2.2.2. Análise de imagem	19
2.2.3. Espectrometria de Massa em <i>Tandem</i> para ceramida e S1P	20
2.2.4. Análise Estatística	21
Capítulo III: Resultados.....	22
3.2. Expressão de LYVE-1 por ensaios de imunohistoquímica.....	23
3.2.1. Modelo de obesidade	23
3.2.2. Modelo de obesidade e doença inflamatória crónica (asma).....	27
3.3. Via de sinalização Cer/S1P.....	30
3.3.1. Modelo de obesidade	30
Capítulo IV: Discussão.....	32
4.1. Modelo animal	33
4.2. Relação entre a dieta e o peso	33
4.2.1. Expressão proteica do LYVE-1	33

4.2.1.1. Relação entre a expressão do LYVE-1 e a dieta nos diferentes tipos de tecido adiposo.....	33
4.2.2. Envolvimento da via de sinalização da Ceramida e Esfingosina-1-Fosfato..	37
Capítulo V: Conclusão	39
Capítulo VI: Perspectivas Futuras	42
Referências Bibliográficas.....	44

Índice de Abreviaturas

Cer – Ceramida

CerS – Ceramida Sintetase

EGF – Factor de Crescimento Epidérmico

ERK - Cinase de regulação de sinal extracelular

FGF-2 – Factor de Crescimento Fibroblástico 2

HIF-1 – Factor Indutor de Hipóxia 1

HFD – Dieta enriquecida em lípidos

HUVECs - Células Endoteliais da Veia Umbilical Humana

IL – Interleucina

LECs – Células Endoteliais Linfáticas

LYVE-1 – Receptor-1 do Hialuronano Linfático Endotelial

m/z – massa/carga

MRM – Monitorização de Reacção Múltipla

PAI-1 – Inibidor-1 do Activador do Plasminogénio

PDGF-B – Polipéptido B do Factor de Crescimento Derivado das Plaquetas

PECAM-1 – Molécula de Adesão Celular Endotelial/Plaquetário 1

PROX-1 – Gene/Factor de Transcrição PROX-1

S1P – Esfingosina-1-Fosfato

Sa - Esfinganina

SM – Esfingomiéline

SNA – Sistema Nervoso Autónomo

SNC – Sistema Nervoso Central

So – Esfingosina

SpK – Cinase da Esfingosina

TAS – Tecido Adiposo Subcutâneo

TAV – Tecido Adiposo Visceral

TGF- β – Factor de Crescimento Tumoral β

TNF- α – Factor de Necrose Tumoral α

UPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometria de Massa

VEGF – Factor de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR – Receptor do Factor de Crescimento Endotelial Vascular

Capítulo I: Introdução

1. Introdução

1.1. O sistema linfático, o tecido adiposo e a obesidade

O sistema linfático constitui uma rede vascular complementar ao sistema vascular sanguíneo, sendo considerado um sistema vital. A vasculatura linfática recolhe os fluidos e as macromoléculas extravasados dos tecidos e redirecciona-os para a circulação sanguínea. Esta rede desempenha importantes funções ao nível da defesa imunitária, transportando antígenos e mensageiros moleculares (tais como, citocinas e quimiocinas) do interstício até aos nódulos linfáticos e órgãos linfóides, funcionando como uma interface entre o corpo e o meio-ambiente. Participa na remoção de bactérias, toxinas e outros elementos tóxicos dos tecidos, redireccionando-os para o sangue, e consequentemente para os órgãos responsáveis para que ocorra a sua eliminação/desintoxicação. Adicionalmente, contribui para a manutenção metabólica, visto ser importante no armazenamento de energia e funções metabólicas, tal como constituir um meio de absorção, armazenamento e ingestão dos lípidos ingeridos (Karpanen & Mäkinen, 2006; Tammela & Alitalo, 2010; von der Weid & Rainey, 2010).

Contrariamente ao sistema vascular sanguíneo, o sistema linfático é formado por uma rede de fluxo unidireccional, no qual a linfa retorna ao sistema cardiovascular. Os vasos linfáticos surgem após a completa formação e estabilização do sistema cardiovascular, sendo que as células endoteliais linfáticas derivam do endotélio venoso. Este sistema inicia o seu desenvolvimento ainda durante a fase embrionária. Na fase adulta, as células endoteliais encontram-se num estado quiescente, contudo, competentes para responder a variados estímulos, acompanhando o crescimento dos vasos sanguíneos em caso de regeneração tecidual, processos cicatriciais e inflamatórios, bem como, proliferação e disseminação tumoral (Jeltsch, Tammela, Alitalo, & Wilting, 2003; Karpanen & Mäkinen, 2006).

Os nódulos linfáticos encontram-se na sua quase totalidade envolvidos por tecido adiposo, e a maioria dos depósitos periféricos de tecido adiposo contém um ou mais nódulos linfáticos (von der Weid & Rainey, 2010).

O tecido adiposo é hoje em dia considerado um órgão endócrino dinâmico, o qual segrega ácidos gordos, hormonas, proteínas, péptidos, factores do complemento, e muitas

outras substâncias bioactivas designadas por adipocinas – citocinas, quimiocinas e produtos da actividade enzimática tecidular - as quais actuam de modo autócrino, parácrino e/ou endócrino. O tecido adiposo branco é composto por aproximadamente 50% de adipócitos, 10% macrófagos, sendo a restante parcela atribuída a pré-adipócitos, fibroblastos e células endoteliais e epiteliais (Karastergiou & Mohamed-Ali, 2010). Todos estes tipos celulares são responsáveis pela secreção de adipocinas. Os factores secretados estão envolvidos em importantes processos fisiológicos, nomeadamente, ao nível da regulação do apetite, metabolismo energético, metabolismo lipídico e da glicose, diferenciação adipocitária, regulação do fluxo vascular sanguíneo e linfático e função imunológica. Em caso de acumulação de tecido adiposo por ingestão de uma dieta gorda, ou por disfunção metabólica, os adipócitos podem desencadear uma reacção inflamatória por falha na drenagem linfática pelos capilares primários. Assim, verifica-se a acumulação de neutrófilos, macrófagos e outros mediadores inflamatórios, bem como a síntese desregulada de adipocinas (especialmente as pró-inflamatórias) no tecido, os quais potenciam o aumento de reacções inflamatórias dos vasos e do interstício. De salientar que a infiltração de macrófagos em obesos está directamente relacionada com a dimensão dos adipócitos, implicando uma modificação dos macrófagos de um fenótipo não-inflamatório para o de células espumosas. Para além da secreção de mediadores inflamatórios como a interleucina-6 (IL-6) ou o Factor de Necrose Tumoral α (TNF α), observa-se um infiltrado com elevado número de macrófagos (Figura 1), sendo provável que as citocinas pró-inflamatórias sejam maioritariamente produzidas por estes, e não unicamente pelos adipócitos (Galic, Oakhill, & Steinberg, 2010; Maenhaut & Van de Voorde, 2011; Poulos, D. B. Hausman, & G. J. Hausman, 2010; von der Weid & Rainey, 2010).

Alguns autores sugerem que o número de adipócitos mortos e macrófagos no tecido adiposo aumenta com o aumento de massa gorda, estando relacionados com a inflamação associada à obesidade, visto esta ser considerada um estado inflamatório crónico de baixo grau (Costa, Incio, & Soares, 2007; Galic *et al.*, 2010; West, 2009). Observa-se então o aumento plasmático das citocinas pró-inflamatórias em resposta à morte adipocitária e às áreas de hipóxia por acumulação de tecido adiposo. Com esse aumento, é possível que o fornecimento de sangue seja comprometido, tornando-se insuficiente. Assim, surgem áreas de hipóxia adipocitária, e conseqüente resposta inflamatória que estimula a angiogénese. Como os vasos sanguíneos necessitam de vasos linfáticos nas suas proximidades de forma a assegurar a manutenção da homeostasia de fluídos nos tecidos, é provável que ocorram

processos linfangiogénicos. A resposta celular ao estado de hipóxia é a produção do factor de transcrição do factor indutor de hipóxia 1 (HIF-1), o qual regula vários genes, e cuja expressão é estimulada por citocinas como o TNF α e IL-6. Alguns dos genes-alvo para o HIF-1 são os factores de crescimento vascular endotelial A, C e D (VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D), os quais desempenham importantes funções na formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos. Além disso, pode existir uma associação entre o aumento de tecido adiposo na obesidade, hipóxia adipocitária e estimulação da linfangiogénese (Schäffler *et al.* 2005; Wellen & Hotamisligil 2003; von der Weid & Rainey 2010).

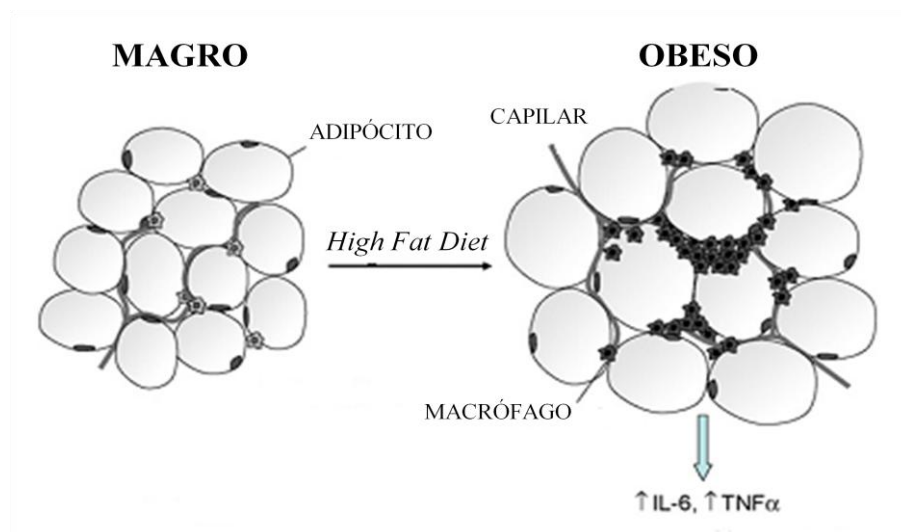


Figura 1 - Aumento da infiltração de macrófagos em caso de obesidade induzida por dieta rica em gorduras (*high fat diet*). A hipertrofia do tecido adiposo contribui para a acumulação de neutrófilos, macrófagos e outros mediadores inflamatórios no tecido, potenciando reacções inflamatórias nos capilares e no interstício. Adaptada de Galic *et al.* 2010.

Recentemente, o papel activo dos macrófagos na linfangiogénese foi apoiado pela descoberta de que estas células podem diferenciar-se em células endoteliais linfáticas, ou partilhar os mesmos progenitores. A diminuição de macrófagos e consequente inactivação contribui para a redução da formação de vasos linfáticos, essencial para a redução do estado inflamatório tecidual (Karpanen & Alitalo, 2008; Karpanen & Mäkinen, 2006; von der Weid & Rainey, 2010).

No que concerne à expressão de adipocinas de acordo com a distribuição do tecido adiposo, observou-se que o padrão secretado pelo tecido adiposo visceral (TAV) apresenta

diferenças relativamente ao tecido adiposo subcutâneo (TAS). Ou seja, o TAV é responsável por uma maior secreção de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, VEGF e IL-6. Este diferencial secretório permite concluir que o potencial danoso do TAV sobre os diferentes órgãos é superior aos efeitos causados pelo TAS (Deng & Scherer, 2010; Karastergiou & Mohamed-Ali, 2010). As diferenças observadas ao nível da expressão de adipocinas contribuem para alterações do fluxo de metabolitos nos sistemas, as quais poderão causar alterações estruturais observadas em diferentes situações patológicas. Destas, destacam-se alterações lipídicas, diabetes, hipertensão e aterosclerose, as quais apresentam elevada correlação com o aumento de TAV.

Estudos realizados em ratinho revelaram existir elevada correlação entre o aumento de adiposidade e a expressão de um número significativo de genes tipicamente expressos pelos macrófagos. Nestes casos, tanto o tamanho dos adipócitos como o peso corporal total revelaram-se preditivos do número de macrófagos encontrados no tecido adiposo, sendo esta relação ainda maior para o TAV do que para o TAS. Assim, estabeleceu-se uma associação entre o aumento de peso no ratinho e a infiltração dos adipócitos pelos macrófagos, e subsequente produção de sinais pró-inflamatórios pelo TA, sendo que estas alterações inflamatórias foram mais visíveis no TAV, o qual está associado a um risco metabólico mais elevado (de Jongh *et al.*, 2006; West, 2009; Wisse, 2004). Por outro lado, e de acordo com estas observações, sugeriu-se que o TAS se encontra associado a *stress* físico e variações de pressão menores, pelo que a própria resposta inflamatória num estado de obesidade subcutânea é menor comparativamente a um estado de obesidade visceral (Deng & Scherer, 2010; West, 2009). É de salientar que a relação entre o tecido adiposo visceral e o padrão inflamatório também foi observado em estudos efectuados no Homem.

1.2.O modelo da doença inflamatória crónica (asma) e a obesidade

A obesidade é ainda um factor de risco para diversas doenças crónicas, como a asma, existindo diversos dados epidemiológicos e estudos sobre os efeitos do aumento e redução de peso indicativos de uma forte relação entre a asma e a obesidade. Alguns dados publicados sugerem uma associação entre a ingestão de uma dieta rica em gordura com uma hipersensibilidade das vias aéreas e risco de desenvolvimento de asma. Assim, estabeleceu-se a existência de um risco relativo significativo de desenvolvimento de asma com estados de excesso de peso e obesidade. A obesidade pode ainda aumentar a gravidade da patologia em indivíduos afectados pela asma, bem como interferir

negativamente com a medicação a estes administrada (Shore, 2007; Wood, Garg, & Gibson, 2011).

Ainda que a etiologia da relação entre obesidade e asma não tenha sido estabelecida, apresentam-se diferentes e variadas explicações. Uma das explicações recentemente apresentada relaciona-se com alterações ao nível da função endócrina do tecido adiposo na obesidade. Como foi referido anteriormente, o tecido adiposo secreta uma elevada quantidade de adipocinas, as quais podem representar um importante elo na relação entre a obesidade e a asma, podendo a obesidade levar ao desenvolvimento ou progressão da asma através de mecanismos inflamatórios. Um vasto conjunto de adipocinas, nomeadamente TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β , PAI-1, VEGFR, entre outros, encontram-se associadas à asma, considerando-se que o aumento da sua expressão num estado de obesidade poderá exacerbar inflamação e/ou obstrução das vias aéreas na asma. A expressão do VEGF encontra-se elevada no soro de indivíduos com excesso de peso e obesos. Em indivíduos com asma, o número de células das vias aéreas que expressam VEGF correlaciona-se directamente com a sua vascularização, e inversamente com o calibre das vias. Também o TNF- α e a IL-6 encontram-se aumentados quer num estado de obesidade quer de asma. Existem ainda estudos em humanos que correlacionam o aumento destes dois marcadores com a ingestão de uma dieta rica em gordura. Além destas explicações, surgem outras considerando uma predisposição genética comum ou aspectos comuns nas condições *in utero*. Assim, são diversos os factores passíveis de contribuir para a relação existente entre obesidade e asma (Beuther, 2010; Van Hove *et al.*, 2009; Shore, 2007; Wood *et al.*, 2011).

No que concerne às estirpes de ratinhos mais utilizadas no estudo da relação entre a obesidade e a asma, observa-se uma preferência pelos C57Bl/6J e BALB/c, sendo que alguns aspectos como a duração da exposição ao alergénio e perfil genético exercem um elevado impacto em características fenotípicas da patologia. Assim, estudos realizados permitiram concluir que a estirpe BALB/c apresenta uma proliferação adaptativa do músculo liso das vias aéreas, sendo ainda a única estirpe a apresentar uma resposta inflamatória mais elevada após exposição prolongada ao alergénio. Ainda assim, não é possível afirmar a existência de um modelo de ratinho passível de mimetizar completamente a patofisiologia de indivíduos asmáticos, principalmente porque esta é uma patologia com elevada heterogeneidade. Deste modo, é necessário ter em consideração o

perfil genético, bem como os diferentes aspectos do fenótipo patológico, aquando da selecção do modelo para estudo (Van Hove *et al.*, 2009).

1.3. Factores de transcrição e diferentes vias de sinalização envolvidas no processo linfangiogénico

O estudo do processo linfangiogénico no contexto da obesidade contempla inúmeras moléculas, designadamente factores de transcrição, as quais se encontram envolvidas em diversas cascatas de sinalização celular. Deste modo, as abordagens adoptadas para o estudo do metabolismo lipídico podem ser diversificadas, complementando-se entre si. As vias associadas à proliferação e morte celulares ao nível vascular e lipídico envolvem múltiplos factores de transcrição, receptores e mediadores de sinal.

1.3.1. PROX-1, VEGFR-3 e os seus ligandos VEGF-C e VEGF-D e LYVE-1

O gene/factor de transcrição PROX-1 (Figura 2) é um marcador específico para o estudo de vasos linfáticos no sistema vascular, revelando-se essencial na determinação da identidade das células endoteliais linfáticas (LECs). As células de rato nas quais não seja expresso o gene PROX-1 não expressam marcadores endoteliais linfáticos, mantendo o fenótipo de vasculatura endotelial sanguínea. Além disso, uma deleção endotelial específica do gene contribui para o desenvolvimento de obesidade, indicando uma eventual associação entre disfunções na drenagem linfática e a obesidade (Saharinen, Tammela, Karkkainen, & Alitalo, 2004).

O VEGFR-3, também conhecido por Flt4, é um dos genes sobre-expressos pelo PROX-1 no endotélio linfático, sendo considerado o regulador *major* da linfangiogénese (Figura 2). A expressão do VEGFR-3 é prévia à formação de vasos linfáticos, sendo numa fase embrionária expresso apenas na vasculatura sanguínea. Ao longo desse desenvolvimento a sua expressão diminui na vasculatura sanguínea, restringindo-se unicamente à vasculatura linfática e capilares sanguíneos fenestrados. Contudo, existem dados que indicam que este receptor pode ser novamente expresso pelo endotélio vascular sanguíneo em situações tumorais, podendo contribuir para a angiogénese e crescimento tumoral (Liersch & Detmar, 2007). A sinalização contínua induzida pelos ligandos do VEGFR-3 é necessária para a sobrevivência e manutenção dos vasos linfáticos durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, tornando-se independentes após este período. Os

dois ligandos do VEGFR-3, VEGF-C e VEGF-D, induzem o crescimento linfático, ainda que não exclusivamente.

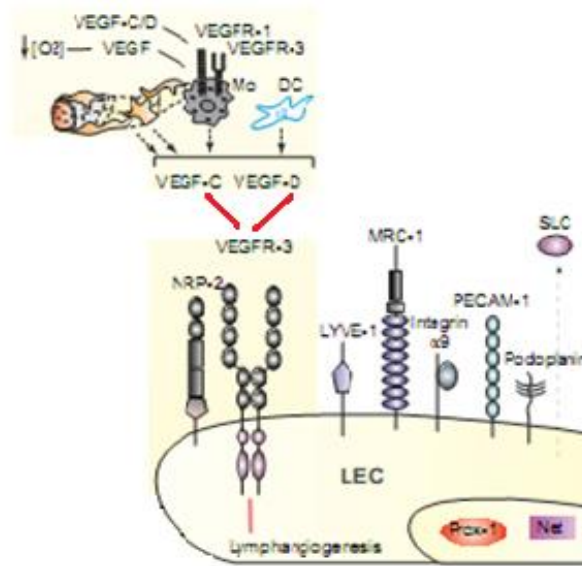


Figura 2 – A heterogeneidade molecular das células endoteliais linfáticas (LECs). Numa situação de hipóxia observa-se a indução da expressão de VEGF- C e D, os quais potenciam o recrutamento de macrófagos positivos para o VEGFR-1 e VEGFR-3. O gene/factor de transcrição PROX-1 desempenha a função essencial na identidade das LECs expressando vários outros marcadores, destacando-se o PECAM-1 e o LYVE-1. Adaptada de Saharinen *et al.* 2004.

O VEGF-C é sobre expresso em resposta a citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que este desempenhe a função de estimulação do crescimento linfático durante a inflamação. Além disso, o seu receptor VEGFR-3, bem como o VEGFR-1, são expressos por uma fracção de monócitos do sangue periférico, ativando os macrófagos. O VEGF-C é essencial para o crescimento organizado da vasculatura linfática, sendo necessário para a proliferação, migração e sobrevivência das LECs até que ocorra a maturação pós-natal da vasculatura linfática (Figura 2). Além desta função, os macrófagos desempenham um papel relevante na expressão do VEGF-C em diversas situações de regeneração do tecido linfático. Encontram-se descritos muitos outros factores de crescimento indutores da linfangiogênese tais como, factor de crescimento hepático (HGF), factor de crescimento derivado das plaquetas B (PDGF-B) e factor de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), por vias dependentes ou independentes do VEGFR-3 (Karpanen & Mäkinen, 2006; Yan, Avraham, Zampell, Aschen, & Mehrara, 2011).

Por outro lado, o VEGF-D, ainda que envolvido na proliferação, migração e sobrevivência das LECs, não é considerado indispensável para o desenvolvimento embrionário de ambos os sistemas vascular e linfático. Esta conclusão advém da observação de apenas uma ligeira redução do número de vasos linfáticos em estruturas pulmonares em caso de deleção deste gene (Karpanen & Mäkinen, 2006; Tammela & Alitalo, 2010).

Os ligandos VEGF-C e D também apresentam afinidade com o receptor VEGFR-2 estabelecendo ligação e ativando-o. Pensa-se que a expressão do VEGFR-2 nos vasos linfáticos contribua para a sinalização quimiotática e mitogénica. Além disso, foi sugerida a sinalização do complexo heterodimérico dos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3, considerada fundamental na migração e proliferação das LECs (Figura 2). Contudo, observou-se que uma forma mutante do VEGF-C, a qual não estimula o VEGFR-2 e VEGFR-3, é suficiente para a estimulação da linfangiogênese e manutenção da vasculatura linfática durante a fase adulta, seja em ratinhos ou humanos (Karpanen & Mäkinen, 2006; Liersch & Detmar, 2007; Schulte-Merker, Sabine, & Petrova, 2011). Outro estudo indica que apenas a activação do VEGFR-2 promove o aumento do calibre das veias linfáticas, mas não a disseminação das mesmas (Schulte-Merker *et al.*, 2011).

O receptor-1 do hialuronano linfático endotelial, também conhecido por LYVE-1, é uma glicoproteína transmembranar tipo I, membro da superfamília de proteínas *Link* e estabelece ligações com o glucosaminoglicano da matriz extracelular hialuronano (Gale *et al.*, 2007; Johnson, Prevo, Clasper, & Jackson, 2007). Encontra-se restrito quase exclusivamente ao endotélio linfático, revelando-se um dos marcadores endoteliais linfáticos mais específicos e amplamente utilizados, sendo também expresso pelos macrófagos. Actualmente, é também utilizado como indicador da competência endotelial linfática. A sua expressão varia com o desenvolvimento da vasculatura linfática, sendo que numa fase adulta a expressão nos vasos colectores diminui, mantendo-se elevada apenas nos capilares linfáticos. Contudo, vários autores consideram controverso e questionável o seu papel essencial no desenvolvimento ou função normais nos vasos linfáticos, existindo estudos que sugerem uma função mais específica ou a existência de mecanismos/receptores compensatórios na sua ausência (Gale *et al.*, 2007; Karpanen & Alitalo, 2008; Tammela & Alitalo, 2010). Outros autores questionam se este receptor não

será expresso apenas em situações de *stress*, como é o caso da inflamação (Cho *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2007).

As diferentes vias e factores de crescimento associados ao endotélio linfático e envolvidos na linfangiogénese contribuem para uma heterogeneidade molecular da qual ainda muito se desconhece. Neste contexto, quando se considera o tecido adiposo e o estado inflamatório que caracteriza a obesidade, muitas mais incógnitas e aspectos controversos surgem para discussão. O objectivo principal do presente estudo é contribuir para desvendar alguns dos mecanismos moleculares subjacentes à linfangiogénese no tecido adiposo no contexto da obesidade.

1.3.2. Esfingolípidos e linfangiogénese: Ceramida e Esfingosina-1-Fosfato

Os esfingolípidos desempenham importantes funções estruturais ao nível da membrana plasmática. Contudo, o papel destas moléculas vai muito além da sua função biofísica, apresentando bioactividade como mediadores de diversos processos celulares, tais como, proliferação, diferenciação, apoptose e inflamação. Assim, as células mantêm um equilíbrio dinâmico dos diferentes metabolitos esfingolipídicos. Destes, e no que concerne a esta bioactividade, destacam-se a ceramida (Cer) e a esfingosina 1-fosfato (S1P). A ceramida pode resultar de diferentes processos: hidrólise da esfingomielina membranar, por acção da esfingomielinase, ou pela síntese *de novo* a partir de ácidos gordos saturados de cadeia longa, via transferase da serina-palmitoil (Figura 3).

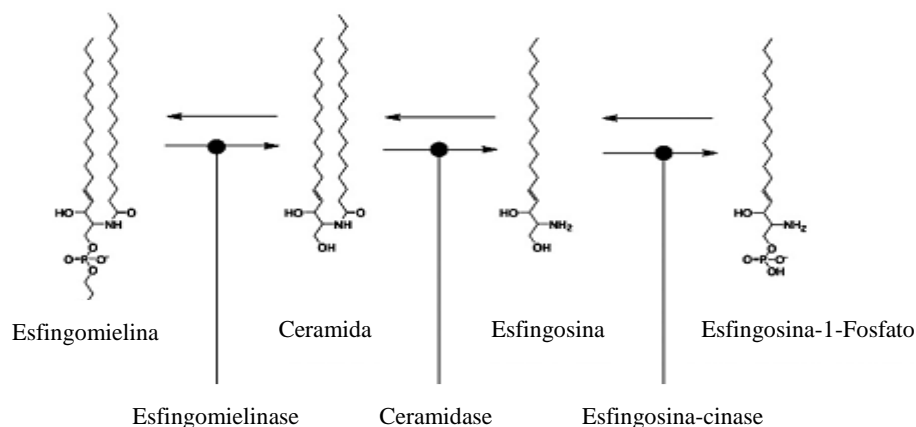


Figura 3 - Diagrama esquemático do metabolismo dos esfingolípidos, e alvos ou metabolitos da esfingomielina e metabolismo dos esfingolípidos. A destacar a degradação reversível da ceramida em S1P, mantendo um equilíbrio associado a uma situação de apoptose ou proliferação celular. Adaptado de Alewijnse & Peters, 2008.

Posteriormente, por acção de duas isoformas da cinase da esfingosina (SpK1 e SpK2), a ceramida pode ser metabolizada em esfingosina, convertendo-se esta em S1P (Gangoiti *et al.*, 2010; Lahiri & Futerman, 2007; Lipina & Hundal, 2011; Samad, Hester, Yang, Hannun, & Bielawski, 2006).

Os estudos realizados com o objectivo de estudar a bioactividade destas moléculas descrevem-nas como envolvidas em diversas vias de sinalização celular, nomeadamente ao nível da regulação de processos de crescimento, motilidade, sobrevivência, senescência e apoptose celulares. Além disso, algumas alterações patofisiológicas, como a obesidade e a diabetes, ao nível do tecido adiposo e plasma, encontram-se associadas a anomalias do metabolismo destes esfingolípidos, entre outros, (Samad *et al.*, 2006). A destacar que, no que concerne aos processos descritos, são propostas funções antagónicas à ceramida e S1P (Figura 4), sendo que a activação de determinada via de sinalização em detrimento de outra deve-se ao equilíbrio entre ambas as biomoléculas (Lahiri & Futerman, 2007; Samad *et al.*, 2006).

A ceramida é caracterizada por ser uma biomolécula, que atingindo determinados níveis intracelulares, apresenta capacidade anti-proliferativa, pró-apoptótica. Adicionalmente, é descrita como responsável por efeitos tóxicos em células mais sensíveis, estando assim associada a complicações como a diabetes e resistência à insulina, inflamação, aterosclerose e alterações neurodegenerativas. Esses níveis intracelulares podem ter origem em variados estímulos extracelulares, tais como, *stresse* oxidativo, óxido nítrico, citocinas pró-inflamatórias (tais como TNF- α , IL-1), lipoproteínas de baixa densidade, níveis elevados de ácidos gordos livres e/ou endotoxinas, condições que caracterizam o tecido adiposo na obesidade. A sua função pró-apoptótica relaciona-se com a activação de cascatas de sinalização envolvendo a activação da caspase por intermédio do citocromo C (Gangoiti *et al.*, 2010; Lahiri & Futerman, 2007). Em todo o caso, é importante salientar que a topologia da formação da ceramida está directamente relacionada com as suas funções de biomolécula reguladora, pelo que nem sempre esta apresenta actividade pró-apoptótica e anti-proliferativa. Um exemplo destas funções é a prevenção de entrada em apoptose das células neuronais (Gangoiti *et al.*, 2010).

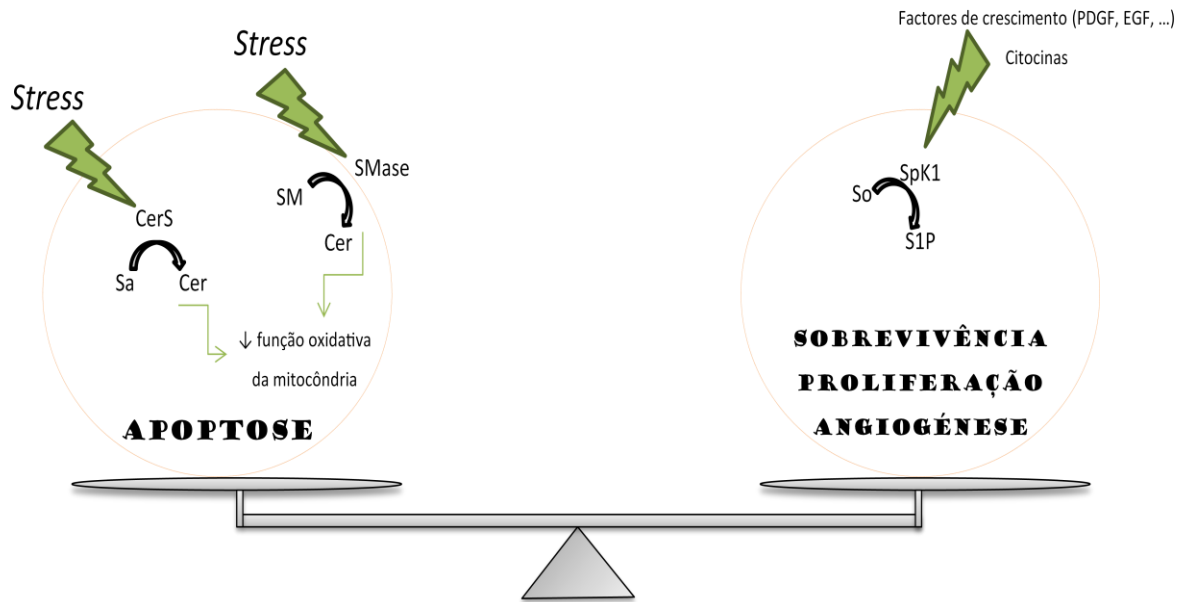


Figura 4 -Representação esquemática das funções da S1P e ceramida na sobrevivência e morte celulares. Mecanismos envolvidos na regulação da produção de ambas as biomoléculas. Abreviaturas: Cer – Ceramida; CerS – Ceramida Sintetase; Sa – Esfingalina; SM – Esfingomielina; SMase – Esfingomielinase; So – Esfingosina; SpK1 – Esfingosina Cinase 1.

Por outro lado, a S1P é uma molécula bioactiva e pluripotencial, sintetizada e secretada por plaquetas, mastócitos e monócitos, e os seus receptores são amplamente expressos. É responsável por múltiplos efeitos sobre variadas células e tecidos, encontrando-se envolvida na proliferação e sobrevivência celular, regulação de processos de migração celular, angiogênese, linfangiogênese e maturação vascular, gênese tumoral e inibição da apoptose induzida pela ceramida, TNF- α e outros agentes tóxicos (Gangoiti *et al.*, 2010; Hla, 2003; Tammela & Alitalo, 2010; Yoon *et al.*, 2008). Esta biomolécula desempenha a sua função de proliferação celular por intermédio de efectores como a fosfolipase C, adenilato ciclase, cinase de regulação de sinal extracelular (ERK), entre outros (Lahiri & Futerma, 2007). Contudo, alguns estudos realizados com células transfectadas com a fosfatase da S1P revelaram um aumento da morte celular em simultâneo com o aumento dos níveis de ceramida e esfingosina. Assim, a regulação da apoptose celular continua a ser considerada a principal função deste mediador lipídico (Hla, 2003). No que concerne à regulação da migração celular, o receptor S1P₂ apresenta-se como um potente inibidor da migração celular induzida pela S1P, bem como os receptores da tirosina-cinase como, por exemplo, IGF-1 e PDGF. Estudos realizados *in vitro* indicam a S1P como um importante regulador da migração celular em estados

patofisiológicos. Destacam-se os tumores primários e as células inflamatórias, situações nas quais a SphK1 é regulada por várias citocinas inflamatórias e angiogénicas tais como, PDGF, EGF, TNF- α e IL-1. Outra hipótese relaciona-se com o microambiente envolvendo o tumor, isto é, as células estromais próximas, plaquetas ou células inflamatórias, activarem as LECs, activando a linfangiogénesse e consequente sobrevivência e proliferação celular (Fyrst & Saba, 2010; Hla, 2003). Assim, uma potencial teoria surge em torno da obesidade, sendo a sua base os efeitos opostos destes dois esfingolípidos nas vias de sinalização comuns, nomeadamente as de proliferação e sobrevivência celulares. Sendo assim, o aumento do tecido adiposo pode estar associado ao aumento de S1P, e consequente capacidade de sobrevivência dos adipócitos, bem como outras células, nomeadamente as inflamatórias, contribuindo assim para a hiperplasia adipocitária observada na obesidade (Holland & Summers, 2008; Lahiri & Futerman, 2007; Samad *et al.*, 2006). Fyrst e Saba referem o aumento da sobrevivência dos cardiomiócitos de mamíferos durante hipóxia potenciada pelo receptor S1P₁. Além desta função, o receptor S1P₁ poderá estar envolvido na regulação do desenvolvimento e manutenção da vasculatura e angiogénesse patológica, visto encontrar-se activamente envolvida na regulação do processo de adesão celular e participar na produção de citocinas (Fyrst & Saba, 2010).

Contudo, e contrariando os dados obtidos ao nível tecidular, estudos com ratinhos obesos demonstraram valores plasmáticos de ceramida e S1P elevados, sem que exista uma explicação bem estruturada para estes resultados, alegando-se uma eventual relação entre o tipo de gorduras ingeridas e o aumento simultâneo de ambos os esfingolípidos (Holland & Summers, 2008; Samad *et al.*, 2006). Outros autores com estudos envolvendo ratinhos, também registaram um aumento, ainda que não muito elevado, dos níveis totais de ceramida plasmáticos e tecidulares. Observaram ainda que a concentração constantemente elevada de TNF- α durante a obesidade, aumenta a biossíntese de ceramida, a qual contribui para diversas alterações características da síndrome metabólica (Yang *et al.*, 2009). Contribuindo para estes resultados contraditórios, encontra-se descrito um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, por indução da S1P e não da ceramida (Samad *et al.*, 2006). Existe contudo um aspecto referido na literatura de que os esfingolípidos produzidos em diferentes locais poderão apresentar funções distintas, sendo uma potencial explicação para as diferenças observadas entre o tecido adiposo e o plasma sanguíneo (Holland & Summers, 2008).

O metabolismo dos esfingolípídeos pode ser activado em diferentes situações, tais como, por acção de citocinas pró-inflamatórias, factores de crescimento e *stress* oxidativo, as quais caracterizam o meio em que se encontra o tecido adiposo na obesidade.

Alguns dos estudos realizados ao nível do tecido adiposo de ratinhos com obesidade geneticamente induzida, verificaram simultânea diminuição do conteúdo em ceramida, e aumento da S1P, comparativamente aos ratinhos controlo. Além disso, o equilíbrio do metabolismo dos esfingolípídeos no tecido adiposo revela tendência para se deslocar no sentido da formação de esfingosina, reduzindo assim a expressão de ceramida no tecido adiposo. No que concerne à linfangiogénesse, alguns autores observaram *in vitro*, a migração e formação de estruturas tubulares semelhantes a capilares de LECs, e linfangiogénesse *in vivo*, em culturas de HUVECs, por estimulação da migração e diferenciação das células endoteliais linfáticas através da via de sinalização S1P₁/G_i/PLC/Ca²⁺. A migração celular induzida pela S1P, observada *in vitro*, foi superior àquela induzida pelo VEGF-C, tendo sido mais aproximada nos estudos *in vivo*. Estes estudos ainda revelaram aumento dos níveis plasmáticos da S1P em condições patológicas, aumentando. Contudo, a concentração local da S1P ao nível tecidular permanece uma incógnita, nomeadamente ao nível do tecido adiposo.

Objectivos

Avaliar se o processo linfangiogénico é alterado qualitativa e quantitativamente na obesidade induzida por ingestão de uma dieta rica em gorduras.

Avaliar a linfangiogénese num modelo de obesidade com e sem doença inflamatória crónica (asma).

Avaliar a linfangiogénese em tecido adiposo subcutâneo e visceral observando eventuais diferenças histológicas por determinação da expressão proteica.

Avaliar uma potencial relação entre o peso dos ratinhos, a expressão do LYVE-1 e os diferentes depósitos de tecido adiposo – subcutâneo e visceral - em ambos os grupos controlo e obeso.

Compreender os mecanismos de sinalização moleculares envolvidos na linfangiogénese no tecido adiposo, por Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada a Espectrometria de Massa (UPLC-MS) e PCR em Tempo Real (RT-PCR).

Capítulo II: Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1. Amostra

Foram utilizados vinte ratinhos machos da estirpe C57Bl/6J (CharlesRiver, EUA) submetidos a uma dieta normal (ND) e a uma dieta rica em gorduras (HFD) (ResearchDiets, EUA), e sacrificados às 12 e 16 semanas. Adicionalmente, foram realizados ensaios num grupo de 18 ratinhos macho da estirpe BALB/c (CharlesRiver, EUA), submetidos ao mesmo tipo de dieta supra-referido, e expostos a um inibidor selectivo do NK-1, sacrificados às 17 semanas.

Extracção de tecido adiposo subcutâneo e visceral para fixação em formol tamponado a 4% e congelação a -20°C.

Toda a manipulação animal decorreu de acordo com as directrizes e regras estipuladas pela União Nacional e Europeia para os cuidados e manipulação de animais de laboratório (Directiva 2010/63/EU).

2.2. Métodos

2.2.1. Imunohistoquímica

No presente estudo, procedeu-se a técnica de imunohistoquímica (IHQ) em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina, pelo que numa fase inicial foi necessário proceder a um processo de recuperação antigénica, isto é, quebrar as pontes metilénicas formadas entre o formol e o tecido, e com o objectivo de o preservar ao longo do tempo, permitindo que os epítomos se encontrem disponíveis para estabelecer ligação com os anticorpos. Previamente à incubação dos anticorpos foi necessário bloquear a actividade das peroxidases endógenas, visto que na etapa de revelação da marcação conferida pelo anticorpo, o cromogénio reage com o peróxido de hidrogénio, gerando produtos de reacção, o que é pretendido apenas na fase final, após incubação com anticorpos. De salientar que o método utilizado foi o indirecto, ou seja, para além do anticorpo primário utilizou-se um anticorpo secundário, o qual ao ligar-se ao primário, vai permitir um aumento da intensidade do “sinal”.

Avaliação qualitativa da linfangiogénese (Figura 5) e remodelação linfática em tecidos fixados em formol tamponado a 4% e parafinados de tecido adiposo visceral e

subcutâneo. Após desparafinação e hidratação dos tecidos, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena em 3% peróxido de hidrogénio em metanol, seguindo-se a recuperação antigénica em tampão citrato de sódio 10 mM e pH 6. Para o bloqueio das proteínas inespecíficas recorreu-se a BSA a 5% (Sigma-Aldrich Co., EUA). Seguiu-se a incubação com o anticorpo policlonal LYVE-1: ab33682 (Abcam plc, UK) coelho anti-ratinho, numa concentração de 1:300. Incubação do tecido previamente marcado com LYVE-1 com o anticorpo secundário biotinilado cabra anti-coelho IgG-B: sc-2040 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA), numa concentração de 1:300. Amplificação do sinal resultante da ligação antigénio-anticorpo pelo sistema VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Inc., EUA), e revelação pela 3,3'-Diaminobenzidina (Abcam plc, UK). Controlo da vasculatura sanguínea pelo anticorpo monoclonal CD31 (PECAM-1) (89C2) (Cell Signaling Technology, Inc., EUA) anti-ratinho, incubado com o anticorpo secundário biotinilado cabra anti-coelho IgG-B: sc-2040 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EUA).

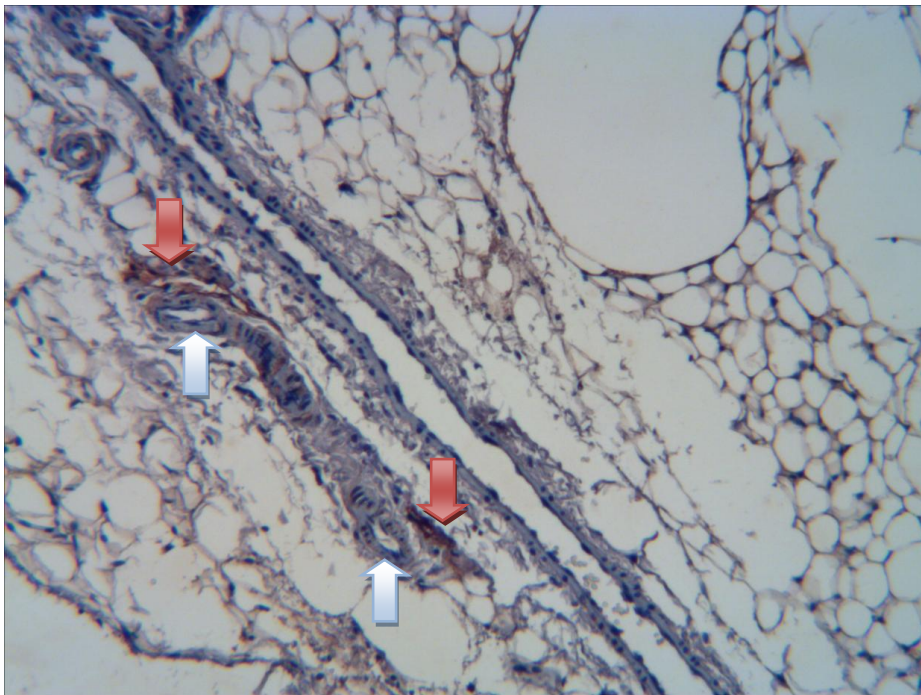


Figura 5 – O LYVE-1 é expresso nos vasos linfáticos, mas não nos vasos sanguíneos de ratinhos adultos. As setas vermelhas indicam os vasos e capilares linfáticos, e as setas azuis identificam vasos sanguíneos em tecido adiposo de ratinho. Ampliação total de 100x.

2.2.2. Análise de imagem

As lâminas histológicas foram observadas com recurso ao microscópio óptico Zeiss Primo Star (VWR International, EUA), com câmara fotográfica digital VisiCam™ 1.3 acoplada, e ligada a um computador. A análise de imagem (Figura 6) foi efectuada com recurso ao software Image J 1.44p (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Foram fotografados 10 campos por lâmina, com uma ampliação total de 100x.

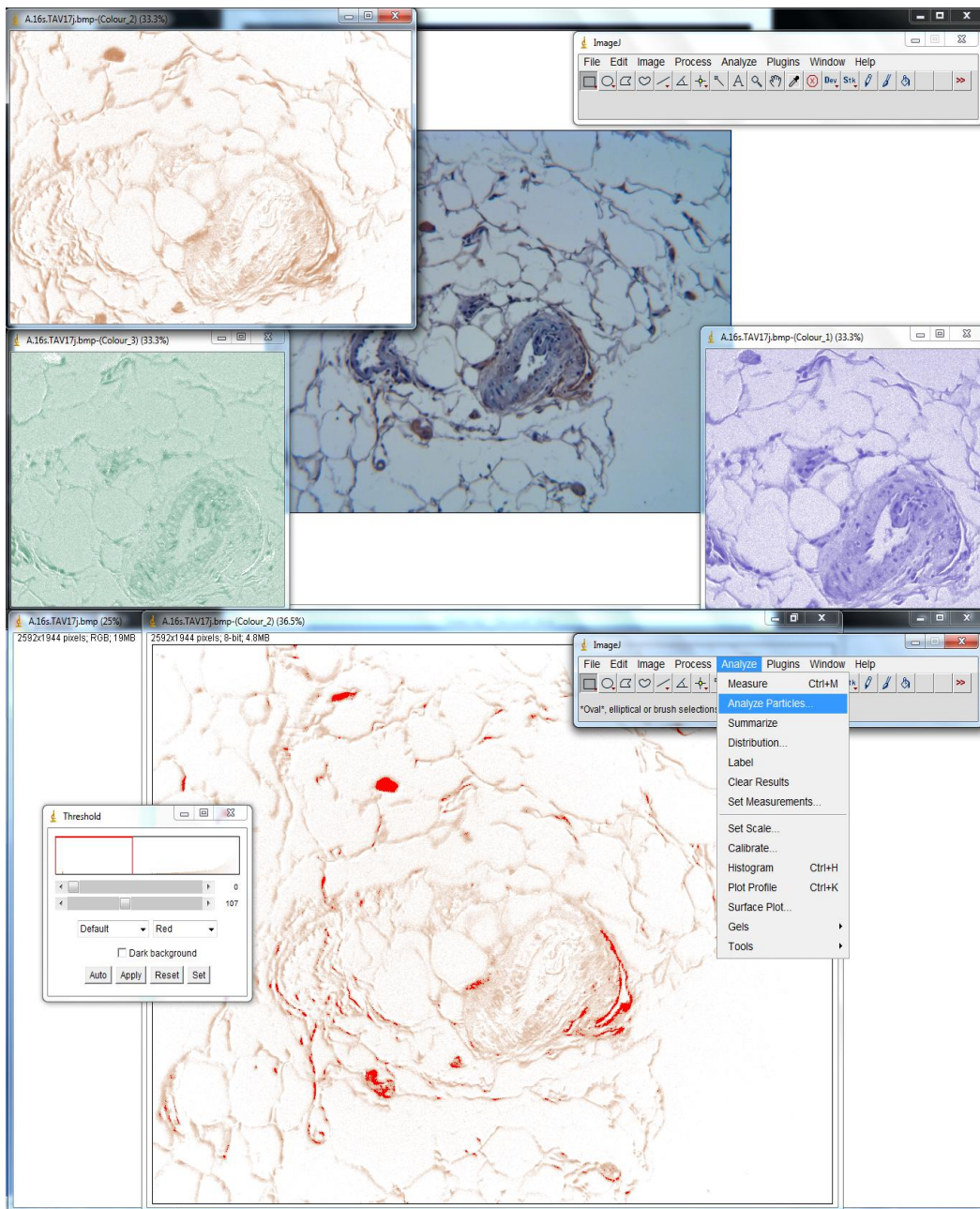


Figura 6 - Visualização exemplificativa do programa de análise de imagem utilizado para quantificação da expressão de LYVE-1 em amostra histológica. Programas de *open-source* ImageJ e Colour Deconvolution.

2.2.3. Espectrometria de Massa em Tandem para ceramida e SIP

A quantificação das espécies individuais (C14, C16, C18, C18:1, C20, C20:1, C24, C24:1) é atingida por monitorização de reacção múltipla (MRM). Na MRM, o primeiro analisador de massa é configurado para passar um precursor iónico massa/carga (m/z) específico, enquanto que o segundo analisador é configurado para permitir a passagem de um determinado produto iónico m/z . De seguida, apenas os iões que encontrem ambos, simultaneamente, nas condições do precursor e produto iónico m/z são transmitidos ao detector. Além disso, utilizado em conjunto com a cromatografia líquida e os padrões internos adequados, a MRM fornece resultados quantitativamente mais precisos por responder a questões críticas em relação à supressão de ionização, cinética da dissociação iónica e sensibilidade. As curvas de calibração são construídas por adição de quantidades variáveis de padrões de esfingolípidos e uma quantidade constante de padrão interno de esfingolípido aos extractos controlo de matriz lipídica, os quais foram posteriormente transportados ao longo de todo o procedimento de isolamento e purificação. O rácio de resposta do esfingolípido ao padrão interno é calculado, e a concentração de esfingolípido é determinada por comparação com a curva de calibração. As áreas sob os picos para quantificação são determinadas através dos cromatogramas iónicos obtidos (Figura 7).

2.2.3.1. Extracção de esfingolípidos de fluidos biológicos (plasma) de ratinho

O homogeneizado plasmático foi fortificado com 50 μL de solução interna standard, e sobrenadante correspondente à fracção orgânica lipídica foi evaporado até secagem completa com recurso a azoto gasoso.

Posteriormente, o resíduo foi ressuspendido em 150 μL de Fase Móvel A, e transferido para o *vial* do *auto-sampler* do UPLC.

2.2.3.2. Quantificação de esfingolípidos por UPLC-MS/MS de plasma de ratinho

As separações foram obtidas com a coluna ACQUITY UPLC BEH C18 de 1.7 micrómetros 2.1 x 150 mm. Todas as análises foram executadas utilizando o equipamento Waters ACQUITY UPLC™ System with a Quattro Premier™ XE Triple Quadrupole (Waters Corporation, Milford, MA) equipado com sonda *Electrospray Ionization* (ESI).

Resumidamente, 10 µL dos extractos ressuspensos foram injectados numa coluna C18 de fase reversa e eluídos a 0,250 mL por minuto, utilizando um gradiente linear de solução de 30% metanol (em 70% H₂O) a 100% metanol, durante 3 minutos.

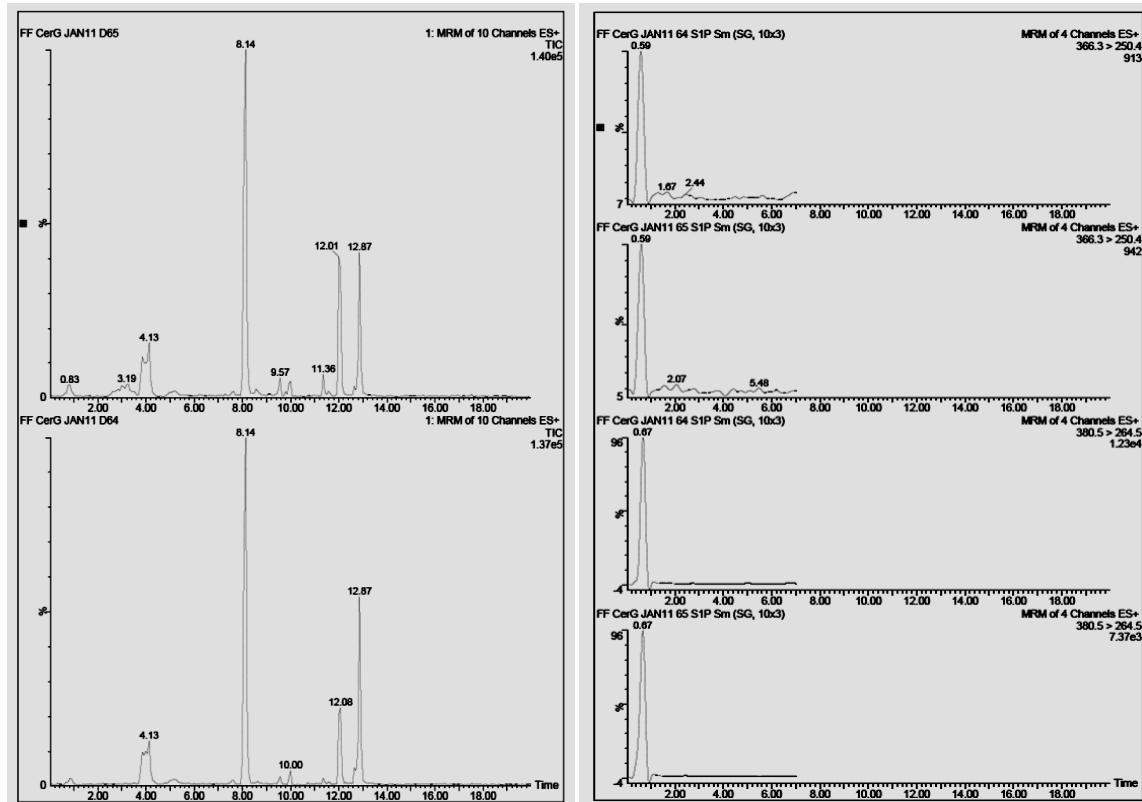


Figura 7 - Cromatogramas exemplificativos da análise dos esfingolípidos Ceramida (A) e S1P (B) através de Cromatografia Líquida de Ultra-Performance acoplada de Espectrometria de Massa, em modelos de obesidade.

2.2.4. Análise Estatística

Para os diferentes casos, dos diferentes tempos de sacrifício, foram calculados a média e o desvio-padrão dos respectivos campos fotografados. A análise estatística dos valores de expressão proteica, e sua relação com as diferentes variáveis em estudo, foi realizada com recurso ao software SPSS 15.0 (SPSS Inc., EUA). Os testes estatísticos não-paramétricos utilizados foram o de Wilcoxon para amostras emparelhadas, de Mann-Whitney para amostras independentes, e Kruskal-Wallis para análise simultânea de mais de uma variável, considerando uma significância estatística de $P < 0,05$.

Capítulo III: Resultados

3. Resultados

Este estudo pretende avaliar o papel da linfangiogénese no tecido adiposo, nomeadamente verificar se a vascularização linfática se encontra alterada em ratinhos obesos comparativamente com ratinhos normais. Um segundo objectivo é investigar possíveis diferenças no processo linfangiogénico em tecido adiposo subcutâneo e visceral. Deste modo, e sabendo que os ratinhos obesos apresentam inflamação sistémica aumentada, espera-se encontrar ainda uma associação entre a capacidade de formação de vasos linfáticos no tecido adiposo e a existência de citocinas pró-inflamatórias séricas.

3.2. Expressão de LYVE-1 por ensaios de imunohistoquímica

3.2.1. Modelo de obesidade

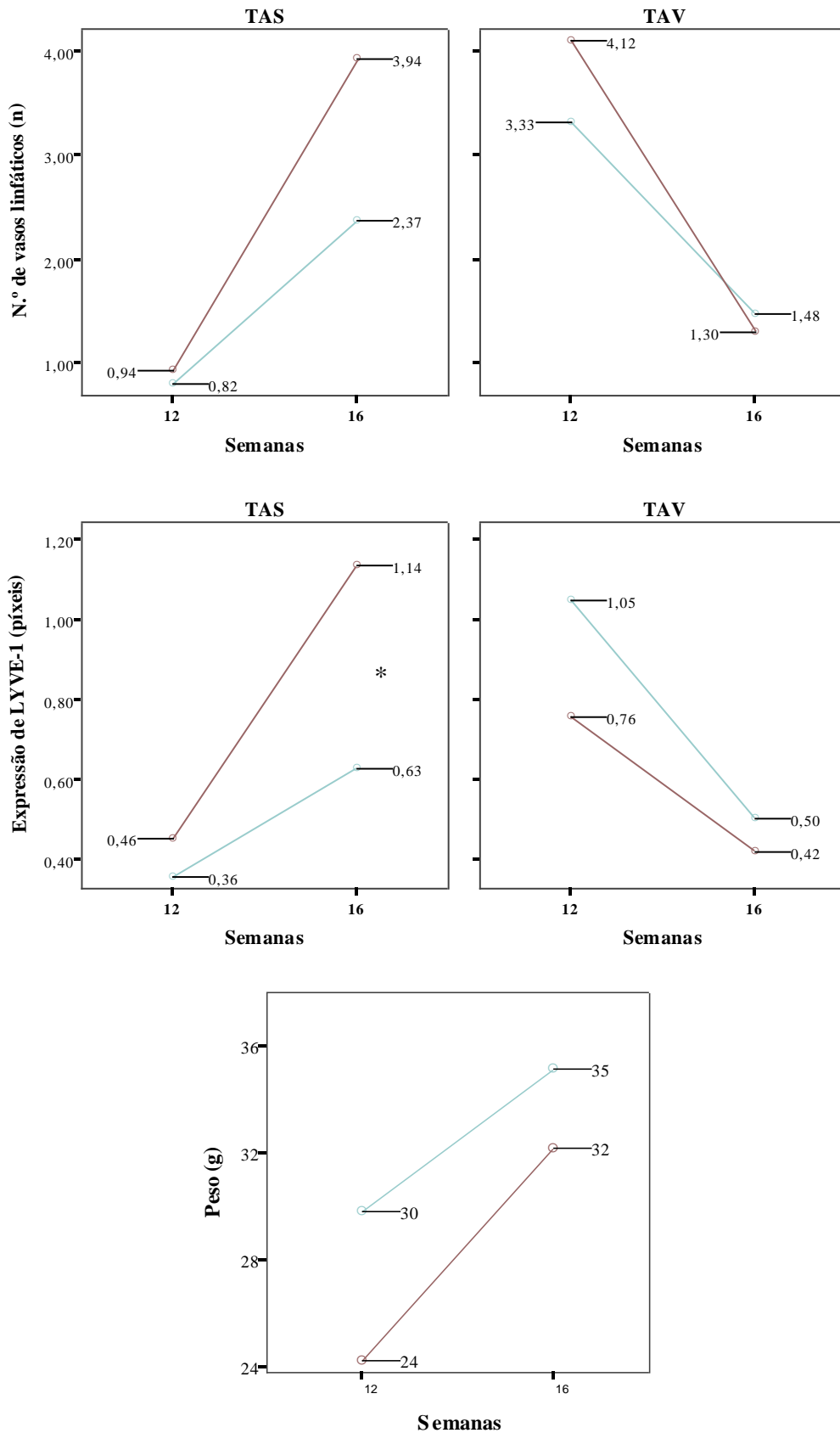
Inicialmente, procedeu-se à avaliação do número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 e peso dos ratinhos (Figura 7 e Figura 8), aos vários tempos de experimentação, nos dois tipos de tecido adiposo em estudo – TAS e TAV, sendo obtidos os seguintes resultados na sua maioria significativos.

A análise do efeito da dieta – ND e HFD - no número de vasos linfáticos, expressão de LYVE-1 e peso dos ratinhos C57Bl/6J, às 12 e 16 semanas, no que concerne aos diferentes tipos de tecido – TAS e TAV - permite observar diferenças, ainda que nem todas apresentem significância estatística.

No que concerne ao TAS, observa-se um aumento do número de vasos linfáticos das 12 para as 16 semanas, sendo sempre superior nos animais submetidos a ND. Por outro lado, o TAV apresenta uma diminuição do número médio de vasos linfáticos das 12 para as 16 semanas, em ambos os grupos de ratinhos – ND e HFD - sendo que a média de vasos linfáticos apenas é superior no grupo HFD às 16 semanas.

Relativamente à expressão de LYVE-1, revela um incremento ao longo do tempo, apresentando-se sempre níveis superiores no grupo ND, comparativamente ao grupo HFD, nas diferentes semanas de avaliação. A diferença observada neste parâmetro entre os dois tipos de dieta, às 16 semanas, revela-se estatisticamente significativa. No entanto, e no que diz respeito ao TAV, esta tendência revela-se contrária, ou seja, a expressão de LYVE-1 sofre uma diminuição ao longo das semanas, sendo superior no grupo submetido a HFD.

O peso dos ratinhos aumenta em ambos os grupos – ND e HFD - ao longo do tempo, sendo superior no grupo HFD como esperado (35g vs. 32 g).



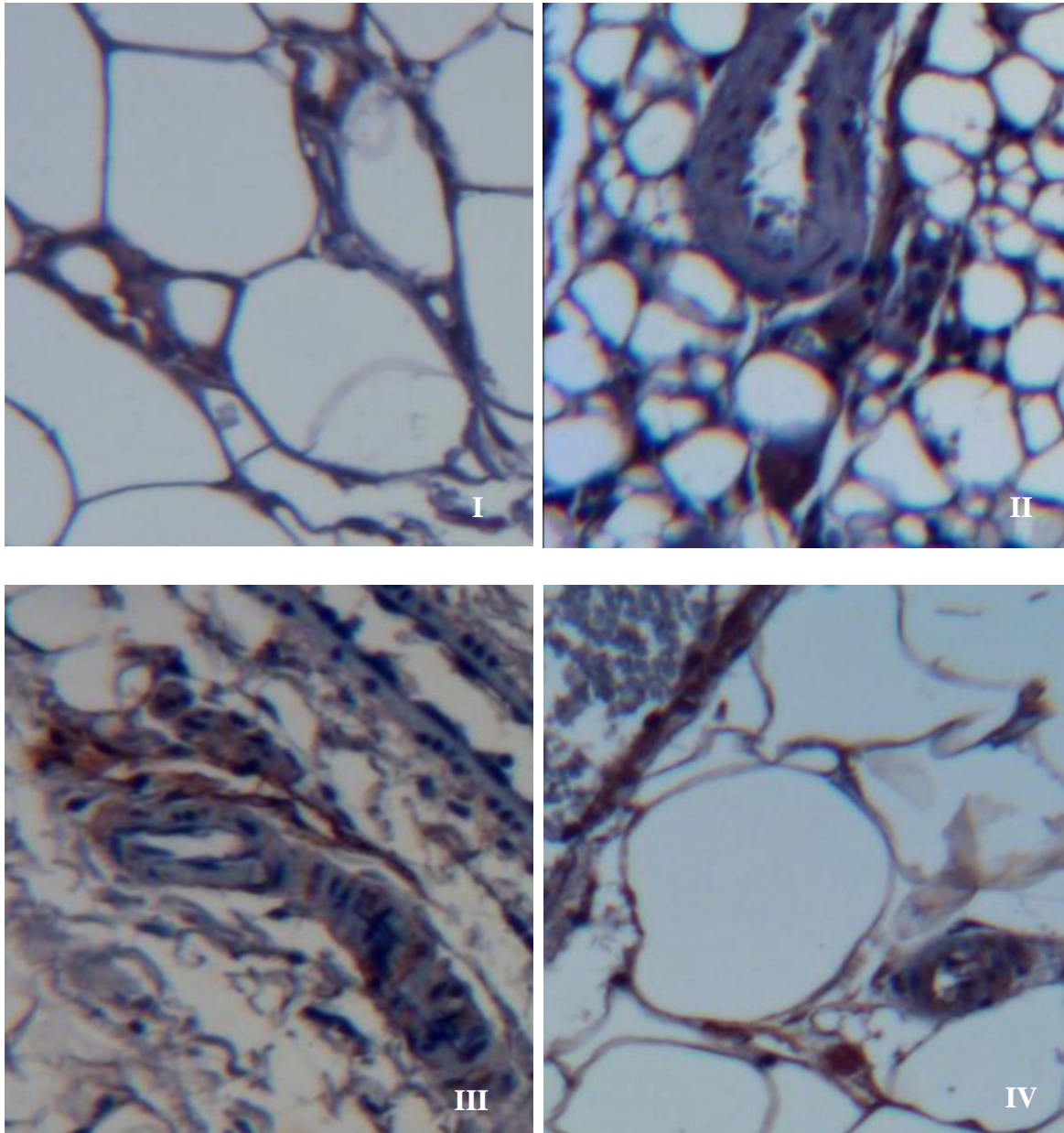


Figura 8 - O efeito da dieta ND (castanho) e HFD (azul) no número de vasos linfáticos, na expressão de LYVE-1 associado à expressão do LYVE-1, e peso, em tecido adiposo subcutâneo (TAS) e visceral (TAV) de ratinhos C57Bl/6J, após um período de 12 e 16 semanas. Os dados são apresentados sob a forma de média. As fotografias correspondem a vasos linfáticos em ambos os tipos de tecido em estudo, TAS (I, III) e TAV (II e IV), às 12 (I e II), 16 (III e IV). Legenda: * - relação estatisticamente significativa.

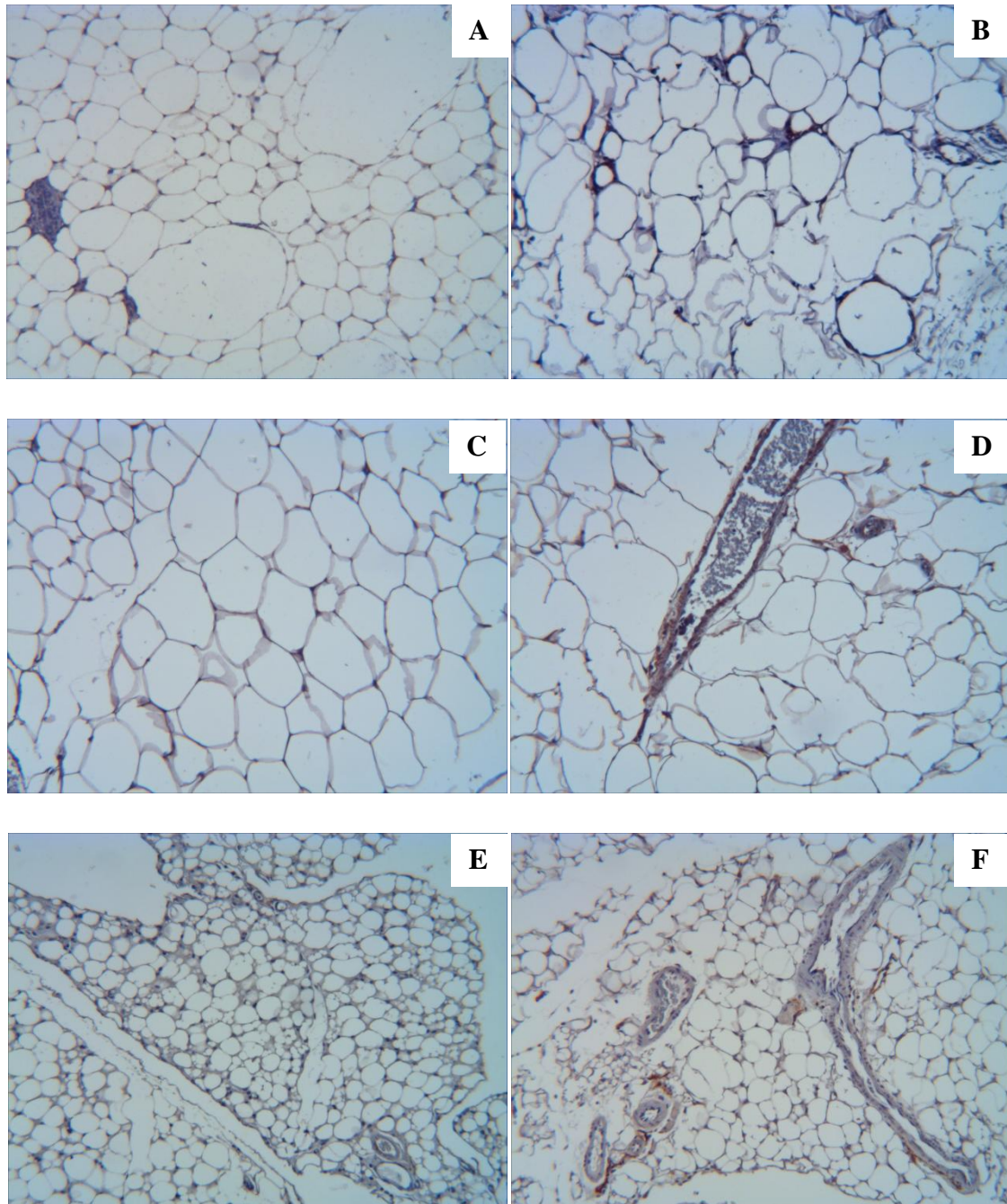


Figura 9 - Representação histológica de cortes de tecido adiposo de ratinho após marcação pelo LYVE-1, por IHQ, com revelação pela DAB. Em A) C) E) e apresentam-se áreas com ausência de expressão de LYVE-1, enquanto que B) D) e F) correspondem a áreas com expressão da proteína. As fotografias A) e B) correspondem ao período de 12 semanas, C) e D) às 16 semanas, nos ratinhos da estirpe C57Bl/6J. As fotografias E) e F) correspondem à estirpe BALB/c às 17 semanas. Ampliação total de 100x.

3.2.2. Modelo de obesidade e doença inflamatória crónica (asma)

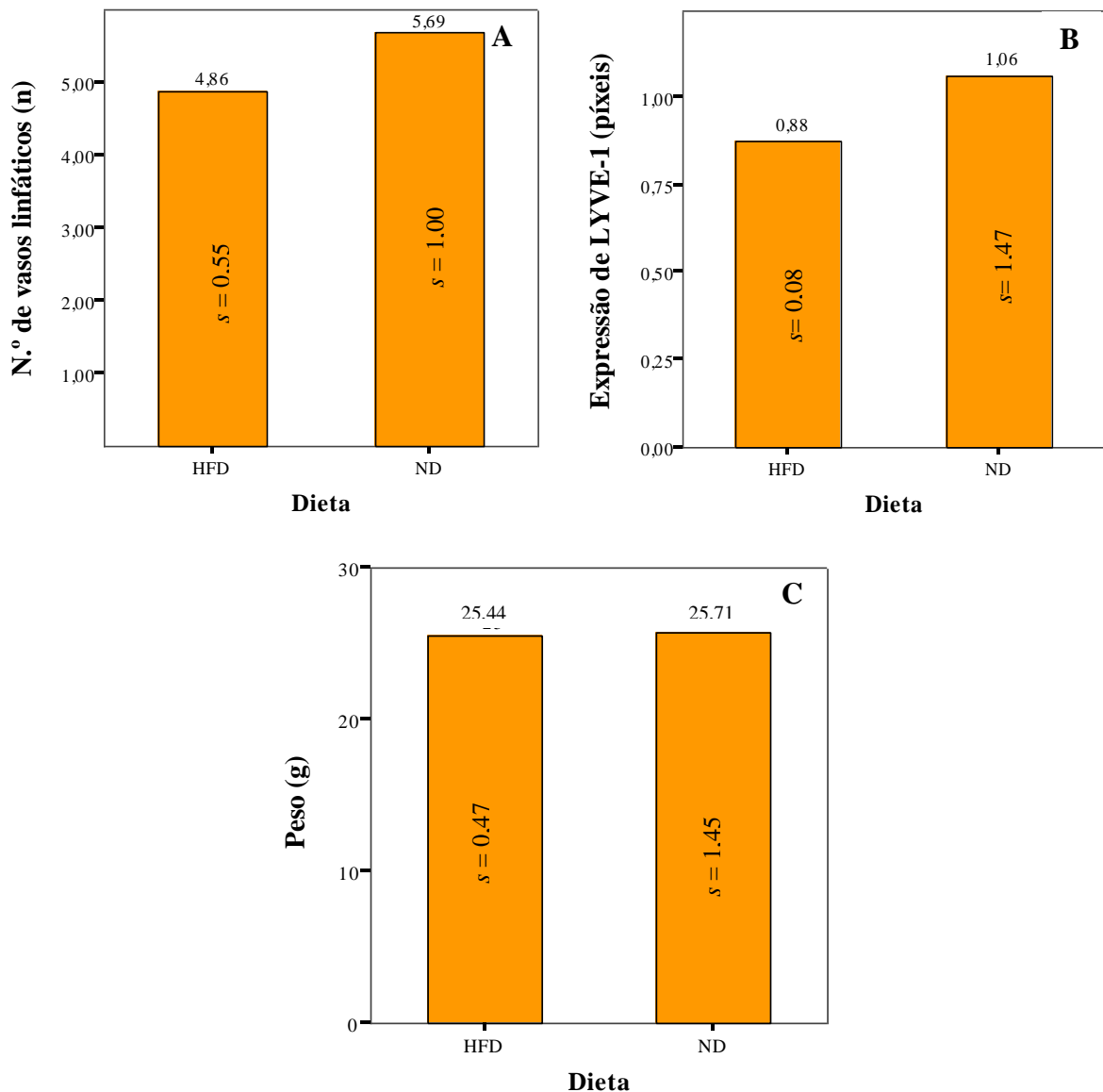


Figura 10 - Distribuição do número de vasos linfáticos (A), expressão de LYVE-1 associado à expressão do LYVE-1 (B), e peso (C) observados em ambos os grupos submetidos a ND e HFD, em tecido adiposo de ratinhos BALB/c, após um período de 17 semanas. Os dados são apresentados sob a forma de média.

Seguidamente procedeu-se à avaliação do número de vasos linfáticos no tecido adiposo de ratinhos BALB/c, submetidos a dieta HFD, utilizando um modelo de inflamação crónica. Ao analisar o número de vasos linfáticos dos ratinhos com 17 semanas, e em função da dieta, observa-se uma média de vasos inferior no grupo submetido a uma dieta rica em gordura (n= 4,86) comparativamente ao grupo submetido a

uma dieta normal (n= 5,69), não sendo, contudo, uma diferença estatisticamente significativa (Figura 11).

Relativamente à expressão de LYVE-1 em ambos os grupos, observa-se uma média inferior nos ratinhos HFD (0,88 píxeis) comparativamente aos ND (1,06 píxeis).

Ao analisar o peso dos ratinhos com 17 semanas, em ambos os grupos submetidos a uma dieta normal (26g) e dieta rica em gorduras (25g), observa-se uma média de pesos bastante próxima (Figura 11C).

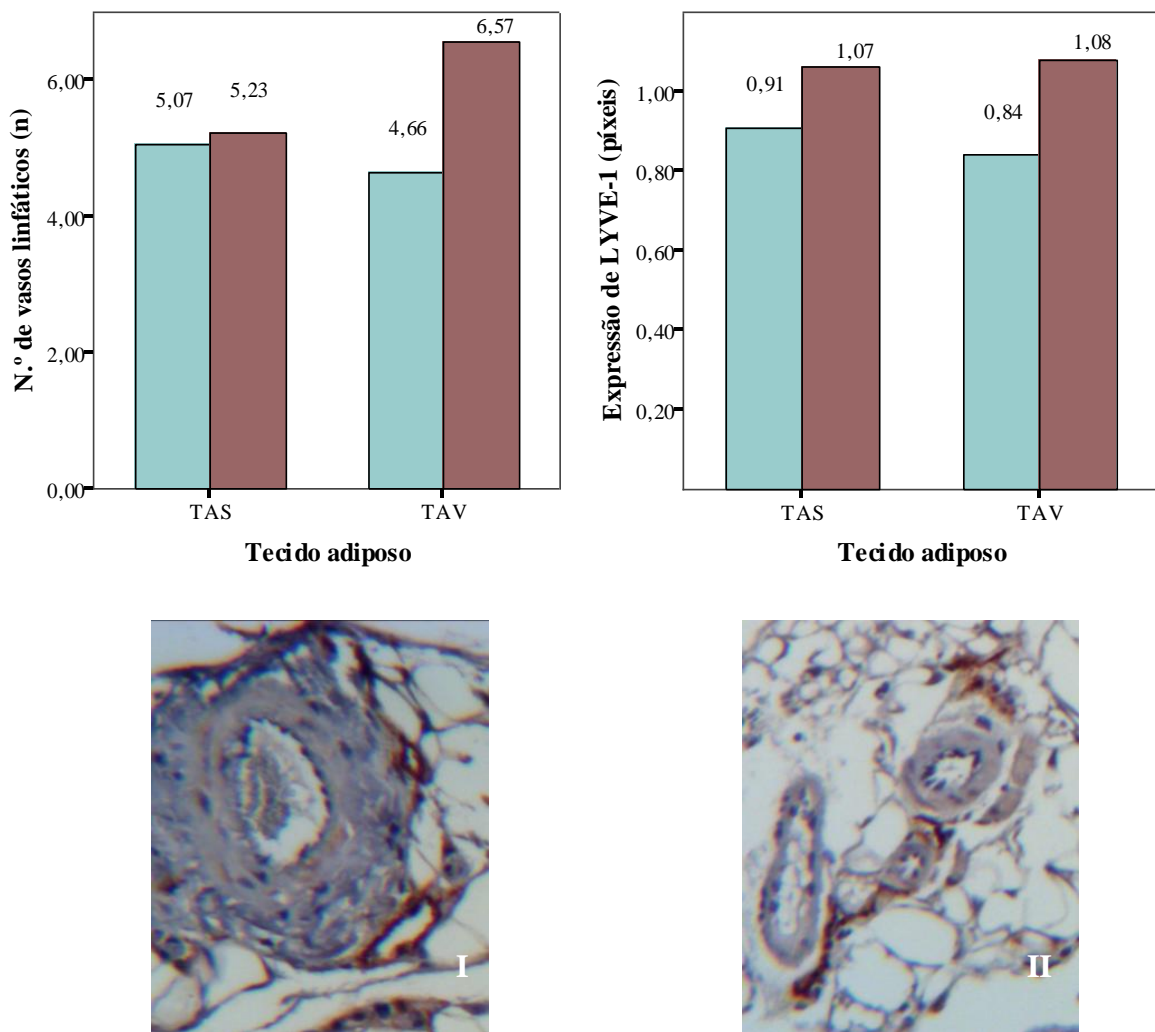


Figura 11 - Distribuição do número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 associado à expressão do LYVE-1 observados em ambos os tipos de tecido adiposo em estudo, TAS e TAV, em função da dieta – ND e HFD - em ratinhos BALB/c, após um período de 17 semanas. Os dados são apresentados sob a forma de média. As fotografias correspondem a vasos linfáticos em ambos os tipos de tecido em estudo – TAS (I) e TAV (II) - às 17 semanas.

Não parece haver diferença significativa entre a densidade de vasos linfáticos ou a sua expressão de LYVE-1 nos dois tipos de tecido adiposo em estudo (TAS ou TAV) em ratinhos BALB/c, considerando ambos os tipos de dieta aos quais foram submetidos – ND e HFD (Figura 12).

No que diz respeito ao número de vasos linfáticos no TAS de ratinhos submetidos a ND é inferior ao observado no TAV. Pelo contrário, a média do número de vasos dos ratinhos submetidos a HFD é superior no TAS.

A expressão de LYVE-1 acompanha a tendência observada no que respeita ao número de vasos linfáticos. Assim, a expressão do LYVE-1 revela-se mais intensa no TAS dos ratinhos submetidos a ND, enquanto que os ratinhos submetidos a HFD apresentam expressão de LYVE-1 superior no TAS (Figura 13).

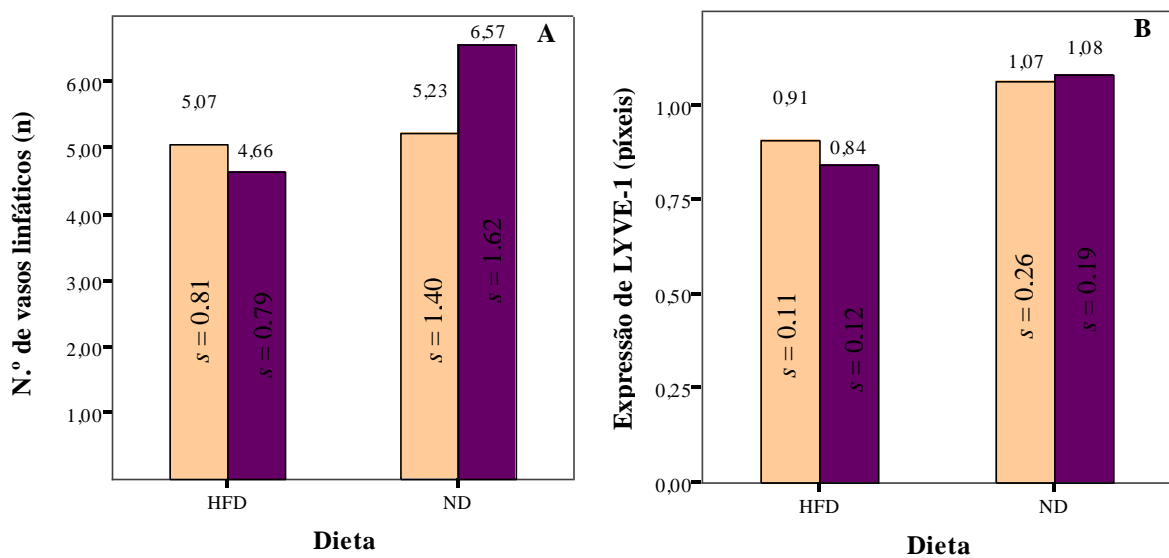


Figura 12 – O efeito da dieta no número de vasos linfáticos (A) e na expressão de LYVE-1 associado à expressão do LYVE-1 (B) em ambos os tipos de tecido adiposo em estudo – TAS (rosa) e TAV (roxo), em ratinhos BALB/c, após um período de 17 semanas. Os dados são apresentados sob a forma de média.

No entanto, a análise dos dois tipos de tecido adiposo, em ambos os grupos ND e HFD, revelou diferenças do número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 entre o TAS e TAV, ainda que não significativas.

Relativamente ao grupo ND, observaram-se médias superiores de número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 no TAV (n=6,57 e 1,08 píxeis) do que no TAS (n= 5,23 e 1,07), com valor $p < 0,05$.

A análise destes mesmos parâmetros no grupo submetido a HFD revelou um comportamento diferente do grupo ND. Assim, observaram-se médias de vasos linfáticos superiores no TAS (n= 5,07 e 0,91 píxeis) relativamente ao TAV (n= 4,66 e 0,84 píxeis).

3.3. Via de sinalização Cer/S1P

3.3.1. Modelo de obesidade

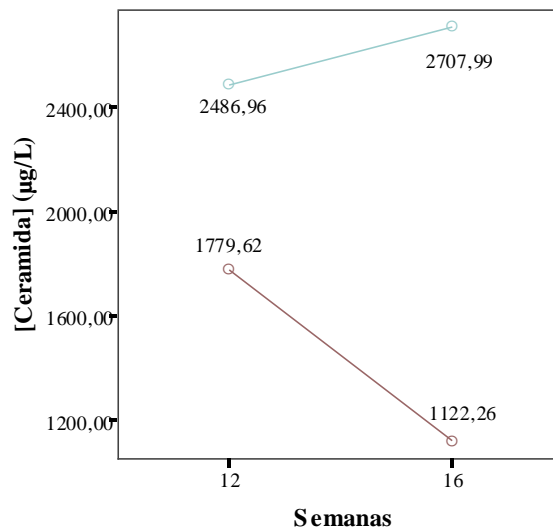


Figura 13 - Análise da concentração de ceramida no soro plasmático dos ratinhos C57Bl/6J às 12 e 16 semanas, por UPLC-MS. A linha castanha corresponde aos valores obtidos para os ratinhos submetidos a ND, e a azul os valores associados à HFD.

A avaliação das concentrações plasmáticas de ceramida nos ratinhos da estirpe C57Bl/6J submetidos a ND diminuíram, progressivamente, ao longo do tempo.

Contrariamente, os ratinhos submetidos a HFD aumentaram a concentração de ceramida até às 16 semanas.

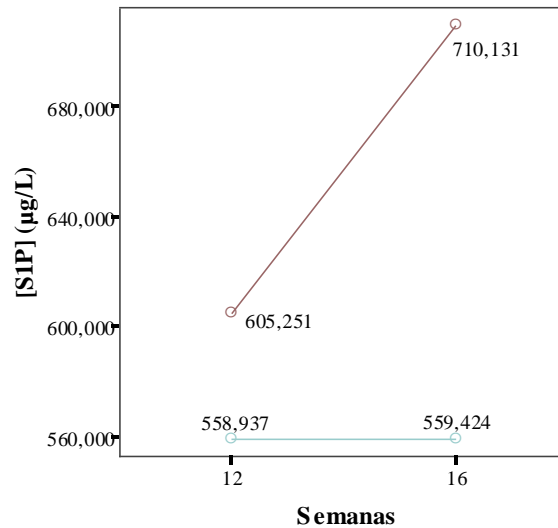


Figura 14 - Análise da concentração da Esfingosina-1-Fosfato (S1P) no soro plasmático dos ratinhos C57Bl/6J às 12 e 16 semanas, por UPLC-MS. A linha castanha corresponde às concentrações obtidas para os ratinhos submetidos a ND, e a azul os valores associados à HFD.

A concentração plasmática de S1P aumentou até às 16 semanas em ratinhos submetidos a ambos os tipos de dieta – ND e HFD, sendo a concentração deste composto no plasma de ratinho ND sempre superiores à obtida no plasma de HFD.

Capítulo IV: Discussão

4. Discussão

4.1. Modelo animal

Os diferentes modelos animais de obesidade utilizados neste trabalho expõem alterações celulares e moleculares inerentes aos mecanismos envolvidos nos processos de inflamação e linfangiogénese. Essas alterações traduzem-se em diferenças relativamente expressivas entre os níveis de expressão proteica e quantidades de esfingolípidos, no processo patológico para os diferentes grupos em estudo – ND e HFD.

4.2. Relação entre a dieta e o peso

Os pesos médios dos ratinhos de ambos os grupos – ND e HFD - em ambas as estirpes estudadas, apresentaram algumas diferenças entre si, ainda que não estatisticamente significativas.

Nos ratinhos C57Bl/6J, observou-se um aumento gradual de peso entre as 12 e as 16 semanas, em ambos os grupos ND e HFD.

Surpreendentemente, os ratinhos BALB/c submetidos a HFD apresentaram uma diminuição de um grama relativamente aos ND, sendo que esta proximidade de valores não está de acordo com o que seria de esperar. Contudo, na ausência de pelo menos mais um período de comparação, não é possível concluir se se trata de uma fase prévia ou posterior ao aumento de peso dos ratinhos HFD. Interessa, contudo, referir que esta estirpe foi utilizada pelo facto de estes animais serem facilmente induzida asma, não sendo contudo um bom modelo de obesidade.

4.2.1 Expressão proteica do LYVE-1

O LYVE-1 é um marcador expresso, quase exclusivamente, no endotélio linfático, sendo utilizado como indicador da competência endotelial linfática. A sua expressão apresenta variações de acordo com o estadio de desenvolvimento da vasculatura linfática.

4.2.1.1. Relação entre a expressão do LYVE-1 e a dieta nos diferentes tipos de tecido adiposo

No que concerne aos ratinhos C57Bl/6J cuja avaliação foi efectuada às 12 e 16 semanas, observaram-se variações pouco significativas no grupo de ratinhos submetidos a

HFD aos diferentes períodos de tempo, relativamente ao grupo submetido a ND, em ambos os tipos de tecido adiposo, TAS e TAV, que alguns apresentam significância estatística.

Observou-se um número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 superiores no TAV, em ambos os grupos ND e HFD, apenas às 12 semanas, ainda que essa diferença não seja estatisticamente significativa. Às 16 semanas observou-se o oposto, apresentando o TAS um maior número de vasos linfáticos e intensidade do marcador.

Assim, e relativamente ao número médio de vasos linfáticos no TAS aumentou ao longo do tempo em ambos os grupos, ND e HFD, sendo sempre superior nos ratinhos submetidos a ND. Contrariamente, no TAV observou-se uma diminuição do número de vasos linfáticos ao longo do tempo em ambos os grupos, destacando-se a superioridade do número médio de vasos nos ratinhos HFD sobre os ratinhos submetidos a ND, às 16 semanas.

A intensidade de expressão do LYVE-1 no TAS aumentou ao longo do tempo em ambos os grupos ND e HFD, revelando-se sempre superior no grupo ND. Por outro lado, e relativamente ao TAV, observou-se uma diminuição do número de vasos ao longo do tempo, sendo constantemente superior no grupo de ratinhos submetidos a HFD.

Teoricamente, o aumento do número de vasos linfáticos e intensidade de expressão do LYVE-1 no TAV está fortemente correlacionado com intensa reacção inflamatória, sobre-expressão de genes pró-inflamatórios, e consequente aumento da secreção de adipocinas. Em comparação com o TAS é considerado o depósito adipocitário com maior risco metabólico (de Jongh *et al.*, 2006; Wisse, 2004). Monteiro *et al.* (2006) refere que os adipócitos do TAS estão sujeitos a menores pressões e *stress* físicos, apresentando menor propensão para a ruptura. Assim, a diminuição do número de vasos e expressão de LYVE-1 observados às 16 semanas, podem estar associados a esse aumento de pressão dos próprios órgãos dos animais sobre o tecido adiposo envolvente (TAV), cuja tendência ao longo do tempo seria de expansão, em contraponto com a baixa pressão sobre o TAS, o qual desempenha funções de protecção superficial e revestimento externo.

Contudo, West (2009) sugere que o reduzido número de macrófagos observado no TAS, bem como a reduzida vasodilatação dependente do fluxo, quando comparado com o TAV, exerce um efeito de protecção da morte adipocitária observado no TAS. Os resultados obtidos poderão ser sustentados por esta teoria, visto que um menor

recrutamento de macrófagos implica uma resposta inflamatória mais branda, e como tal, menor crescimento e proliferação linfática.

Outra explicação para a diminuição de ambos os parâmetros às 16 semanas poderá relacionar-se com os adipócitos, no período de avaliação, ainda se encontrarem na fase de hipertrofia, e conseqüente produção de factores pró-inflamatórios, e adipocinas em geral, para posterior libertação para o meio extracelular, e assim desencadear a resposta inflamatória perante a condição de obesidade.

No que concerne à dieta, esperava-se um maior número de vasos e expressão de LYVE-1 associados ao grupo HFD em virtude do aumento do tecido adiposo, e subsequente despoletar do processo inflamatório (Galic *et al.*, 2010; Wellen & Hotamisligil, 2003). O tecido adiposo de ratinhos submetidos a ND está descrito como secretor de adipocinas anti-inflamatórias, e conseqüentemente, menos vascularizado do que o tecido adiposo de animais obesos (Galic *et al.*, 2010). Contudo, alguns autores referem que o aumento de massa gorda está associado a um aumento do número de adipócitos, o qual não é acompanhado de uma vascularização adequada, quer em número ou densidade dos capilares. Assim, observa-se um aumento do estado de hipóxia que poderá contribuir para um aumento da taxa de morte adipocitária, sobrepondo-se assim à proliferação de vasos linfáticos (Lee, Wu, & Fried, 2010; Maenhaut & Van de Voorde, 2011; Wellen & Hotamisligil, 2003). Os resultados obtidos nos referidos parâmetros – número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 – podem estar relacionados com um “atraso” no desenvolvimento da vasculatura linfática nos ratinhos HFD devido ao estado de hipóxia previamente referido.

Por outro lado, e uma vez mais, poderá estar em causa a hipertrofia inicial dos adipócitos, e não a hiperplasia, pelo que ainda não ocorreu a libertação de adipocinas para o meio extracelular, e como tal, não se observam os efeitos associados ao processo inflamatório. Assim, a inversão de resultados no grupo HFD, em contraponto com o grupo ND, no TAV, às 16 semanas, poderá corresponder ao despoletar da resposta inflamatória, existindo um crescimento e proliferação significativos do número de vasos linfáticos.

No modelo de asma e obesidade, observou-se um número de vasos linfáticos e intensidade de expressão de LYVE-1 superiores no grupo ND comparativamente ao grupo submetido a uma dieta enriquecida com gordura. Salvaguardando, uma vez mais, a

ausência de dados relativos a tempos prévios ou posteriores, apenas é possível proceder a uma comparação entre ambos os grupos ND e HFD. O estudo deste modelo permitiu ainda observar número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1 no TAS superiores ao TAV no grupo HFD, enquanto que no grupo ND observaram-se resultados contrários.

O reduzido número de vasos linfáticos, bem como os níveis de expressão do LYVE-1 no grupo HFD, poderá representar uma situação de hipóxia, à semelhança do modelo de obesidade sem doença crónica, e defendido por alguns autores (Maenhaut & Van de Voorde, 2011; Wellen & Hotamisligil, 2003). Adicionalmente, e perante a disfunção adipocitária adveniente da situação de hipóxia, o tecido pode ainda iniciar um processo de remodelação adipocitária, o qual, numa fase inicial, poderá não necessitar de uma vasta rede vascular sanguínea e linfática. Além disso, e relativamente ao aporte sanguíneo, e potencial paralelismo para com vasos linfáticos, alguns autores indicam existir um aumento de fluxo sanguíneo proporcional ao aumento de tecido adiposo, contudo, o fluxo por adipócito diminui de modo inverso. Deste modo, o suprimento de oxigénio e nutrientes essenciais à proliferação celular são comprometidos (Lee *et al.*, 2010)

O número de vasos linfáticos no TAS de ratinhos submetidos a ND é inferior ao observado no TAV. Pelo contrário, a média do número de vasos dos ratinhos submetidos a HFD é superior no TAS. A expressão de LYVE-1 acompanhou a tendência observada no que respeita ao número de vasos linfáticos. Assim, a expressão do LYVE-1 revelou-se mais intensa no TAS dos ratinhos submetidos a ND, enquanto que os ratinhos submetidos a HFD apresentaram níveis de expressão de LYVE-1 superiores no TAS.

Uma explicação possível para a diferença, ainda que não significativa, entre o TAS e TAV reside no exacerbado processo inflamatório associado aos ratinhos asmáticos, o qual associado à ingestão de uma dieta rica em gorduras pode promover a proliferação de vasos linfáticos (Shore, 2007; Wood *et al.*, 2011). Pelo contrário, o TAS é referido por vários autores como estando associado a um processo inflamatório menos reactivo (de Jongh *et al.*, 2006; Monteiro & Azevedo, 2010; Wisse, 2004).

Além destes aspectos, é importante salientar que o modelo de asma e obesidade (estirpe BALB/c) apresenta processos inflamatórios mais agressivos do que o modelo de obesidade (estirpe C57Bl/6J), o que certamente também contribuirá para as maiores diferenças observadas entre os diferentes parâmetros considerados, nomeadamente o

número de vasos linfáticos, expressão de LYVE-1 e concentração da Cer e S1P (Van Hove *et al.*, 2009).

4.2.2. Envolvimento da via de sinalização da Ceramida e Esfingosina-1-Fosfato

Os estudos metabolómicos (lipidómica) dos esfingolípido ceramida e S1P no plasma de ratinho C57Bl/6J, ainda que não significativas, revelaram concordância com alguns dos parâmetros já analisados.

Assim, as concentrações de ceramida em ratinhos submetidos a ND foi diminuindo de forma progressiva ao longo do tempo, enquanto que a dos ratinhos HFD aumentou até às 16 semanas. De acordo com a informação existente sobre este esfingolípido, e de autores como Gangoiti *et al.* (2010), a diminuição da concentração de ceramida deve-se a diversos factores, sendo que a secreção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de ácidos gordos em estados de obesidade podem justificar o aumento da concentração de ceramida observado até às 16 semanas. Ou seja, o estado inflamatório observado nesta fase despoletou efeitos anti-proliferativos e anti-apoptóticos, por aumento da concentração de ceramida plasmática.

No que concerne à S1P observou-se um aumento progressivo da concentração plasmática, ao longo do tempo, o que é concordante com o facto de este esfingolípido ser sintetizado por células inflamatórias, como plaquetas e mastócitos, bem como, desempenhar funções ao nível da proliferação e sobrevivência celulares, linfangiogénese e inibição da apoptose induzida pela ceramida (Gangoiti *et al.*, 2010; Hla, 2003; Yoon *et al.*, 2008). Os resultados obtidos encontram-se em concordância com os resultados obtidos ao nível do número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1, nos ensaios histológicos correspondentes.

O facto dos ratinhos submetidos a ND apresentarem uma concentração de S1P superior à dos ratinhos HFD poderá estar relacionado com o estado avançado de hipóxia, referido anteriormente, o qual não permite ainda a manifestação das funções de proliferação e anti-apoptóticas da S1P. Assim, talvez numa avaliação mais tardia, o processo inflamatório já poderia ter sido desencadeado, promovendo o processo linfangiogénico e, conseqüentemente, o aumento da concentração de S1P num estado de obesidade.

Ainda que considerando o conhecimento prévio das funções antagónicas de ambos os esfingolípidos, o aumento simultâneo da concentração plasmática de ceramida e S1P entre as 12 e 16 semanas reúne menor entendimento, sendo que não existe, até ao momento, qualquer explicação bem estruturada para estes resultados. Ainda assim, e de acordo com trabalhos realizados em células por Hla (2003), é possível observar-se um aumento da morte celular em simultâneo com o aumento dos níveis de ceramida e esfingosina.

A diferença de resultados obtidos entre os ensaios histológicos e plasmáticos, segundo Holland & Summers (2008), pode dever-se ao facto de esfingolípidos produzidos em diferentes locais apresentarem padrões de expressão e função distintos.

Capítulo V: Conclusão

5. Conclusão

A análise dos resultados da expressão proteica e esfingolípídica no modelo animal de linfangiogénese em ratinho obeso permitiu detectar algumas diferenças significativas nos parâmetros em estudo – número de vasos, expressão de LYVE-1 e concentração de ceramida e S1P.

A resposta inflamatória avaliada através do número de vasos linfáticos permite afirmar que num estado inicial de obesidade a proliferação linfática poderá estar a ser retardada pela hipertrofia adipocitária. Assim, a libertação de adipocinas será observada apenas numa fase posterior, desencadeando todo o processo inflamatório que incrementará a proliferação linfática.

A intensidade de expressão dos marcadores acompanha a tendência observada no número de vasos linfáticos, contribuindo assim para a ideia de que os adipócitos ainda se encontram numa fase de hipertrofia, pelo que os vasos linfáticos existentes apresentam menor calibre e densidade, aumentando o seu calibre, e consequentemente a expressão de LYVE-1, apenas com o desencadear e adensar da resposta inflamatória ao estado de obesidade, por exigência de uma maior aporte nutricional e drenagem linfática.

No que concerne ao tipo de tecido, e considerando a homogeneidade dos resultados em ambos os parâmetros, número de vasos linfáticos e expressão de LYVE-1, é possível sugerir que a maior pressão à qual o TAV se encontra sujeito não favorece a proliferação linfática, pelo menos num estadio inicial, sendo que seria relevante aumentar o tempo de estudo de modo a concluir se o despoletar de um intenso processo inflamatório contribuiria para um aumento significativo da proliferação linfática neste tipo de tecido, associado a um maior risco metabólico.

A análise da concentração de ceramida e S1P apresenta resultados não suficientemente esclarecedores, revelando-se essencial a continuação deste estudo de modo a evitar uma conclusão precoce. Ainda assim, é possível afirmar que as concentrações de ceramida e S1P corroboram a existência de um processo inflamatório nos ratinhos em estudo, ainda que numa fase muito inicial.

O modelo asmático e obeso de ratinhos da estirpe BALB/c revelou não ser o mais adequado ao estudo da obesidade. Contudo, permitiu concluir que num modelo de ratinho

asmático, a ingestão de dieta rica em gorduras contribui para o incremento da linfangiogénesse no TAV, mas não no TAS, após 17 semanas de tratamento.

Assim, a obesidade provoca um estado inflamatório sistémico, o qual é promovido pela linfangiogénesse no TAV.

Este estudo sugere a importância da análise da expressão proteica do LYVE-1 em estados de obesidade e processo inflamatório associado, de modo a que possam ser desenvolvidos métodos e potenciais drogas que auxiliem o controlo da proliferação de tecido adiposo a longo-prazo.

Capítulo VI: Perspectivas Futuras

6. Perspectivas Futuras

De modo a ultrapassar determinados obstáculos, e esclarecer algumas questões associadas aos resultados obtidos, deveriam ser executadas algumas reestruturações ao plano experimental elaborado.

Assim, deverá ser aumentada a dimensão da amostra em ambos os grupos, ND e HFD, permitindo obter maior significância dos resultados, e assim aumentar o poder de esclarecimento de determinadas diferenças.

Adicionalmente, e de modo a realizar uma análise mais completa e esclarecida, será prolongado o tempo de estudo.

O esclarecimento acerca da relação entre o tamanho dos adipócitos e o tipo de tecido adiposo com o despoletar e desenvolvimento do processo inflamatório também contribuirá para o enriquecimento do estudo.

No que concerne à análise lipidómica da via de sinalização Cer/S1P, seria de elevado interesse e pertinência proceder à avaliação simultânea da expressão de esfingolípidos no soro plasmático e tecidos-alvo, permitindo assim compreender o comportamento dos esfingolípidos na obesidade, e sua contribuição para o processo linfangiogénico. Seria ainda enriquecedor, compreender o seu envolvimento no modelo de doença crónica (asma) e obesidade, avaliando o seu mecanismo molecular.

Por último, mas não menos relevante, em virtude da escassez de dados, revelar-se-ia interessante estudar uma eventual relação entre o género (macho ou fêmea) com o processo linfangiogénico na obesidade.

Referências Bibliográficas

- Beuther, D. A. (2010). Recent insight into obesity and asthma. *Current opinion in pulmonary medicine*, 16(1), 64-70.
- Chen, Z., Varney, M. L., Backora, M. W., Cowan, K., Solheim, J. C., Talmadge, J. E., & Singh, R. K. (2005). Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. *Cancer research*, 65(19), 9004-11.
- Cho, C.-H., Koh, Y. J., Han, J., Sung, H.-K., Jong Lee, H., Morisada, T., Schwendener, R. A., *et al.* (2007). Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circulation research*, 100(4), e47-57.
- Costa, C., Incio, J., & Soares, R. (2007). Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis*, 10(3), 149-66.
- Deng, Y., & Scherer, P. E. (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1212(1), E1-E19.
- Fyrst, H., & Saba, J. D. (2010). An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nature chemical biology*, 6(7), 489-97.
- Gale, N. W., Prevo, R., Espinosa, J., Ferguson, D. J., Dominguez, M. G., Yancopoulos, G. D., Thurston, G., *et al.* (2007). Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Molecular and cellular biology*, 27(2), 595-604.
- Galic, S., Oakhill, J. S., & Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*, 316(2), 129-39.
- Gangoiti, P., Camacho, L., Arana, L., Ouro, A., Granado, M. H., Brizuela, L., Casas, J., *et al.* (2010). Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease. *Progress in lipid research*, 49(4), 316-34.
- Hla, T. (2003). Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 47(5), 401-7.
- Holland, W. L., & Summers, S. A. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocrine reviews*, 29(4), 381-402.
- Van Hove, C. L., Maes, T., Cataldo, D. D., Guéders, M. M., Palmans, E., Joos, G. F., & Tournoy, K. G. (2009). Comparison of acute inflammatory and chronic structural asthma-like responses between C57BL/6 and BALB/c mice. *International Archives of Allergy and Immunology*, 149(3), 195-207.
- Jeltsch, M., Tammela, T., Alitalo, K., & Wilting, J. (2003). Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell and tissue research*, 314(1), 69-84.

- Johnson, L. A., Prevo, R., Clasper, S., & Jackson, D. G. (2007). Inflammation-induced uptake and degradation of the lymphatic endothelial hyaluronan receptor LYVE-1. *The Journal of biological chemistry*, 282(46), 33671-80.
- de Jongh, R. T., Ijzerman, R. G., Serné, E. H., Voordouw, J. J., Yudkin, J. S., de Waal, H. A. D.-van, Stehouwer, C. D. A., *et al.* (2006). Visceral and truncal subcutaneous adipose tissue are associated with impaired capillary recruitment in healthy individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(12), 5100-6.
- Karastergiou, K., & Mohamed-Ali, V. (2010). The autocrine and paracrine roles of adipokines. *Molecular and cellular endocrinology*, 318(1-2), 69-78.
- Karpanen, T., & Alitalo, K. (2008). Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annual review of pathology*, 3, 367-97.
- Karpanen, T., & Mäkinen, T. (2006). Regulation of lymphangiogenesis--from cell fate determination to vessel remodeling. *Experimental cell research*, 312(5), 575-83.
- Lahiri, S., & Futerman, A. H. (2007). The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 64(17), 2270-84. doi:10.1007/s00018-007-7076-0
- Lee, M.-J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2010). Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 13(4), 371-6.
- Liersch, R., & Detmar, M. (2007). Lymphangiogenesis in development and disease. *Thrombosis and haemostasis*, 98(2), 304-10.
- Lipina, C., & Hundal, H. S. (2011). Sphingolipids: agents provocateurs in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetologia*, 1-12-12. Springer Berlin / Heidelberg.
- Maenhaut, N., & Van de Voorde, J. (2011). Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC medicine*, 9(1), 25.
- Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*, 2010.
- Poulos, S. P., Hausman, D. B., & Hausman, G. J. (2010). The development and endocrine functions of adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology*, 323(1), 20-34.
- Saharinen, P., Tammela, T., Karkkainen, M. J., & Alitalo, K. (2004). Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends in immunology*, 25(7), 387-95.
- Samad, F., Hester, K. D., Yang, G., Hannun, Y. A., & Bielawski, J. (2006). Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes*, 55(9), 2579-87.

- Schulte-Merker, S., Sabine, A., & Petrova, T. V. (2011). Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *The Journal of cell biology*, *193*(4), 607-18.
- Schäffler, A., Schölmerich, J., & Büchler, C. (2005). Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, *2*(2), 103-11.
- Shore, S. A. (2007). Obesity and asthma: lessons from animal models. *Journal of Applied Physiology*, *102*(2), 516-528.
- Tammela, T., & Alitalo, K. (2010). Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*, *140*(4), 460-76.
- von der Weid, P.-Y., & Rainey, K. J. (2010). Review article: lymphatic system and associated adipose tissue in the development of inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *32*(6), 697-711.
- Wellen, K. E., & Hotamisligil, G. S. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, *112*(12), 1785-8.
- West, M. (2009). Dead adipocytes and metabolic dysfunction: recent progress. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, *16*(2), 178-82.
- Wisse, B. E. (2004). The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *15*(11), 2792-800.
- Wood, L. G., Garg, M. L., & Gibson, P. G. (2011). A high-fat challenge increases airway inflammation and impairs bronchodilator recovery in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *127*(5), 1133-40.
- Yan, A., Avraham, T., Zampell, J. C., Aschen, S. Z., & Mehrara, B. J. (2011). Mechanisms of lymphatic regeneration after tissue transfer. (M. Tjwa, Ed.) *PloS one*, *6*(2), e17201. Public Library of Science.
- Yang, G., Badeanlou, L., Bielawski, J., Roberts, A. J., Hannun, Y. A., & Samad, F. (2009). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, *297*(1), E211-24.
- Yoon, C. M., Hong, B. S., Moon, H. G., Lim, S., Suh, P.-G., Kim, Y.-K., Chae, C.-B., *et al.* (2008). Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/Gi/PLC/Ca²⁺ signaling pathways. *Blood*, *112*(4), 1129-38.