



2013

O efeito da berberina na resistência à insulina em ratos diabéticos

Ana Luísa Ferreira Faustino



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O efeito da berberina na resistência à insulina em ratos diabéticos

Ana Luísa Ferreira Faustino

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O efeito da berberina na resistência à insulina em ratos diabéticos

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

Ana Luísa Ferreira Faustino

2013

Agradecimentos

Agradeço profundamente à minha orientadora, Professora Doutora Cristina Sena, pela oportunidade, apoio, compreensão, ensinamentos e paciência que demonstrou durante o tempo que tive a realizar este trabalho.

Agradeço aos meus pais e irmãos pelo apoio, compreensão e ajuda que sempre me deram, sem eles nunca teria sido possível ter efetuado este percurso académico.

A todos os meus colegas de laboratório pelo apoio e ajuda, especialmente à Ana.

Agradeço a todos os meus amigos que mesmo sem perceber o meu trabalho sempre me ouviram e tentaram ajudar, nem que fosse através de companhia nos piores momentos. Marta, Joana e Ana um obrigado especial pelos belos momentos de esparecimento pós trabalho.

Ao Tiago, obrigado pelo apoio e por me ouvires quando mais precisei e me sentia desorientada.

Agradeço profundamente à Professora Doutora Raquel Seiça pelo apoio e ensinamentos.

A todos o meu sincero obrigado.

Ana Luísa Ferreira Faustino

Índice geral

Índice de figuras	I
Índice de tabelas	III
Abreviaturas	IV
Resumo	VI
Abstract	VIII
1. Introdução	1
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	2
1.2 Músculo-esquelético	3
1.2.1 Fisiologia do músculo-esquelético	3
1.2.2 Funções fisiológicas do músculo-esquelético	5
1.3 Fígado	5
1.3.1 Fisiologia do fígado	5
1.3.2 Funções fisiológicas do fígado	6
1.4 Transporte de glicose	7
1.4.1 Via da insulina	8
1.4.2 Via da AMPK	10
1.5 Resistência à insulina	13
1.5.1 Causas possíveis relacionadas com o desenvolvimento de resistência à insulina	15
1.5.1.1 PI3-cinase	15
1.5.1.2 PKC	16
1.5.1.3 Aumento da fosforilação de serinas nas proteínas IRS	16
1.5.1.4 Ácidos gordos livres	18
1.5.1.5 <i>Forkhead box protein O-1</i>	19
1.5.1.6 PTP1B	20
1.5.2 Resistência à insulina no fígado	21
1.5.3 Resistência à insulina no músculo-esquelético	21

1.6 Berberina	22
1.6.1 Efeitos gerais da berberina no metabolismo da glicose	23
1.6.2 Efeitos gerais da berberina no metabolismo dos lípidos	23
1.6.3 Efeitos gerais da berberina no fígado	23
1.6.4 Efeitos gerais da berberina no músculo-esquelético	24
2. Materiais e métodos	25
2.1 Materiais	26
2.2 Métodos	26
2.2.1 Animais	26
2.2.2 Tratamento	27
2.2.3 Peso corporal	27
2.2.4 Determinação da glicemia e da Hemoglobina-A1c	27
2.2.5 Determinação dos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres	28
2.2.6 Determinação dos níveis plasmáticos de insulina	28
2.2.7 Colheitas	28
2.2.7.1 Colheitas de sangue	28
2.2.7.2 Colheitas de urina	29
2.2.7.3 Colheitas de órgãos	29
2.2.8 Homogeneização do fígado	29
2.2.9 Homogeneização do músculo-esquelético	29
2.2.10 <i>Western blot</i>	30
2.2.11 Análise estatística	32
3. Resultados	33
3.1 Caracterização geral	34
3.1.1 Peso corporal	34
3.1.2 Perfil glicémico e HbA1c	34
3.1.3 Perfil lipídico	35
3.1.4 Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres	36
3.1.5 Níveis plasmáticos de insulina	36
3.2 Caracterização da resposta hepática ao tratamento com berberina	37
3.2.1 AMPK total e fosforilada	37
3.2.2 IRS-1 total e fosforilada	38
3.2.3 AKT total e fosforilada	39

3.3 Caracterização da resposta no músculo-esquelético ao tratamento com berberina	40
3.3.1 AMPK total e fosforilada	41
3.3.2 IRS-1 total e fosforilada	42
3.3.3 AKT total e fosforilada	43
3.3.4 Troponina total e fosforilada	44
4. Discussão	45
5. Conclusão	51
6. Bibliografia	53

Índice de figuras

Figura 1: Ilustração de um corte transversal de músculo-esquelético.	3
Figura 2: Ilustração de parte de uma fibra do músculo-esquelético.	4
Figura 3: Ilustração de um corte longitudinal do fígado.	6
Figura 4: Representação esquemática da família de proteínas GLUT.	7
Figura 5: Via de sinalização da insulina que conduz à estimulação da captação de glicose e à síntese de glicogénio.	10
Figura 6: Via de sinalização da AMPK.	11
Figura 7: Estrutura da AMPK.	12
Figura 8: Via de sinalização da insulina e respetivas funções.	14
Figura 9: Representação do gene do IRS-1.	17
Figura 10: Mecanismo proposto para o desenvolvimento de resistência à insulina induzida pela dislipidemia.	19
Figura 11: Representação da regulação do metabolismo da glicose e dos lípidos através de fatores de transcrição <i>forkhead</i> .	20
Figura 12: (a) Estrutura molecular da berberina. (b) <i>Berberis vulgaris</i> L.	22
Figura 13: Mecanismo da berberina na regulação do metabolismo.	24
Figura 14: Níveis plasmáticos de ácidos gordos (mM) em ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B) durante 3 meses.	36
Figura 15: Níveis plasmáticos de insulina ($\mu\text{g/L}$) em ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B) durante 3 meses.	37

Figura 16: Determinação do conteúdo proteico de AMPK (total e fosforilada) no fígado de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). 38

Figura 17: Determinação do conteúdo proteico de IRS-1 (total e fosforilado) no fígado de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). 39

Figura 18: Determinação do conteúdo proteico de AKT (total e fosforilada) no fígado de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). 40

Figura 19: Determinação do conteúdo proteico de AMPK (total e fosforilada) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). 41

Figura 20: Determinação do conteúdo proteico de IRS-1 (total e fosforilado) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). 42

Figura 21: Determinação do conteúdo proteico de AKT (total e fosforilada) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). 43

Figura 22: Determinação do conteúdo proteico de troponina (total e fosforilada) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). 44

Índice de tabelas

Tabela I: Soluções utilizadas em <i>Western blot</i> .	32
Tabela II: Peso Corporal.	34
Tabela III: Glicemia, em jejum e 2 horas após administração de glicose e HbA1c.	35
Tabela IV: Níveis de colesterol total, triglicerídeos e colesterol não HDL.	35

Abreviaturas

ACC - Acetil-CoA carboxilase;

AKT - Proteína cinase B;

AMP - Monofosfato de adenosina;

AMPK - Proteína cinase ativada pelo AMP;

ATP - Trifosfato de adenosina;

B – Berberina;

BSA - Albumina de soro bovino;

CBS – Sintase da cistationina β ;

C/EBP – *CCAAT/enhancer binding protein*;

DNA - Ácido desoxirribonucleico;

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético;

eNOS - Sintase de monóxido de azoto endotelial;

ERK – Cinase regulada por sinais extracelulares;

FAS - Sintase de ácidos gordos;

Foxo - *Forkhead box*;

GK - *Goto-Kakizaki*;

GLUT4 - Transportador de glicose 4;

G6Pase – Glicose 6 fosfatase;

HbA1c - Hemoglobina A1c;

HDL - Lipoproteína de alta densidade;

HmGCoA - Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA;

HOMA-IR - Modelo de avaliação da homeostasia;

IL-4 - Interleucina 4;

IRS - Substrato do recetor da insulina;

JNK – Cinase do fator de transcrição c-Jun;

LDL – Lipoproteína de baixa densidade;

LDL-C - Quantidade de colesterol contido na lipoproteína de muita baixa densidade;

MAPK - Cinase das proteínas ativadoras de mitogénese;

mTORC1 - Alvo do complexo 1 da rapamicina em mamíferos;

PKB - Cinase-1 dependente de fosfoinosítídeos;

PEPCK - Carboxicinase da fosfoenolpiruvato;

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato;

PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato;

PI3-cinase - Fosfatidilinositol 3-cinase;

PKB - Proteína cinase B;

PKC - Proteína cinase C;

PPAR γ – Recetor gama ativado por proliferador de peroxissoma;

PTB - Domínio de ligação a fosfotirosina;

PTB1B – Proteína tirosina fosfatase 1B;

PVDF - Membrana de fluoreto de polivinilideno;

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α ;

VLDL - Lipoproteína de muita baixa densidade;

W – Wistar.

Resumo

A diabetes *mellitus* tipo 2 é um distúrbio metabólico onde o metabolismo dos hidratos de carbono e lípidos se encontra alterado. Esta doença agrava-se com a idade, como consequência da alteração/degeneração dos processos metabólicos do organismo associados ao envelhecimento e, surge cada vez mais precocemente como resultado de alterações no estilo de vida da população. Os mecanismos/processos que levam ao aparecimento deste distúrbio não são completamente compreendidos mas têm sido demonstrado que a resistência à insulina e a obesidade são fatores que potenciam o aparecimento de diabetes tipo 2. As complicações vasculares são a principal causa de morbidade e morte em pacientes diabéticos pelo que se torna imperativo desenvolver terapias que atenuem a sua progressão.

A berberina é um alcalóide natural existente nas raízes, caules e rizomas de diversas espécies de plantas. Tem sido utilizado desde a antiguidade na medicina tradicional chinesa e asiática para o tratamento de infeções bacterianas e parasíticas. O seu efeito benéfico na resistência à insulina e no abaixamento da hiperglicemia foi descoberto por acaso quando administrada em pacientes diabéticos com diarreia. Apesar dos inúmeros estudos efetuados os seus efeitos ainda não são completamente compreendidos. Este trabalho teve como objetivo estudar o potencial terapêutico da berberina na resistência à insulina em ratos diabéticos não obesos e ratos Wistar normais.

Para o presente estudo foram avaliados 4 grupos experimentais, 2 grupos de ratos Wistar, um controlo e outro sujeito a tratamento com berberina (W+B) e 2 grupos GK, um controlo e outro sujeito a tratamento (GK+B). A berberina (100 mg/kg) foi administrada por via oral durante três meses. Foram analisados diferentes parâmetros metabólicos e as duas principais vias envolvidas na translocação dos transportadores GLUT4 no fígado e músculo-esquelético.

Foi verificado que o tratamento com berberina melhorou o perfil glicémico mas não alterou o perfil lipídico. Neste estudo não houve ativação da via da AMPK nem da via da insulina nos tecidos estudados, o que sugere a possibilidade de outras vias moleculares estarem envolvidas no mecanismo de ação da berberina na diabetes tipo 2.

Palavras-Chave: Diabetes *mellitus* tipo 2, AMPK, resistência à insulina, fígado, músculo-esquelético, berberina, via da insulina.

Abstract

Type 2 diabetes *mellitus* is a metabolic disorder that alters the mechanisms through which the carbohydrates and lipids are metabolized. This disorder develops mainly as a consequence of the alteration/degradation of the metabolic processes of the organism due to aging, but in consequence of the changes observed in the lifestyle in recent years, this disorder is developing earlier, and is increasingly more common in the population. It isn't certain how the disorder develops, but it has been shown that insulin resistance and obesity are factors that lead to the manifestation of the disorder. It is the leading cause of morbidity and mortality due to microvascular and macrovascular complications that the individuals develop with the progression of the disorder. Hence it is imperative to create and develop therapies that mitigate the harmful effects the patients manifest.

Berberine is a natural alkaloid existing in roots, stems and rhizomes of several species of plants. It has been used since ancient times by Chinese and other Asiatic countries in traditional medicine for the treatment of bacterial and parasitic infections. Its beneficial effect on insulin resistance and on lowering hyperglycemia was discovered when berberine was administered in diabetic patients with diarrhea. Although many studies have already been carried out its effects are not yet entirely understood. This work aimed to study the therapeutic potential of berberine on insulin resistance in diabetic and normal Wistar rats.

For this project four experimental groups were evaluated, two groups of Wistar rats, one control and another treated with berberine (W + B) and 2 groups of GK rats, one control and the other with treatment (GK + B). The berberine (100 mg / kg) was administered orally for three months. Several metabolic parameters were analyzed along with the two major pathways involved in the translocation of GLUT4 in the liver and skeletal muscle.

We found that treatment with berberine improved the glycemic profile but did not affect the lipid profile. In this study there was no activation of the AMPK pathway or the insulin pathway in the tissues that were studied, suggesting the possibility of

other molecular pathways being involved in the mechanism of action of berberine on type 2 diabetes.

Keywords: Type 2 diabetes *mellitus*, AMPK, insulin resistance, liver, skeletal muscle, berberine, insulin pathway.

1. Introdução

1.1 Diabetes *mellitus* tipo 2

A diabetes *mellitus* tipo 2 é uma desordem metabólica heterogênea caracterizada pela desregulação do metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos devido a defeitos na secreção da insulina e/ou ação da insulina (O'Brien *et al.* 1996; Zhang *et al.*, 2011). Espera-se que o número de indivíduos com diabetes tipo 2 aumente para 300 milhões até 2025 devido à maior prevalência de obesidade, ao aumento da esperança média de vida e estilo de vida sedentário (Kiberstis, 2005; Zhang *et al.*, 2011).

A diabetes tipo 2 desenvolve-se quando existe uma disfunção da célula beta do pâncreas e/ou resistência à insulina nos tecidos periféricos como o fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo (Zhou *et al.*, 2007). Em indivíduos sem diabetes, a normoglicemia é mantida pelo equilíbrio entre as concentrações de glicose circulante (com origem na produção hepática e na absorção intestinal) e a glicose captada pelos tecidos periféricos. Nos pacientes com diabetes tipo 2 a falência relativa ou absoluta da secreção de insulina leva a um estado de hiperglicemia (níveis de glicose sanguínea acima dos valores normais). Por outro lado, a resistência à insulina, redução da capacidade da insulina estimular a captação de glicose, leva ao aumento da produção hepática de glicose ao mesmo tempo que diminui a captação e utilização desta no músculo-esquelético mantendo os níveis de glicose sanguínea elevados (DeFronzo e Tripathy, 2009).

Para além da hiperglicemia, diversos sintomas, incluindo a hiperlipidemia estão envolvidos no desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares que são responsáveis pela elevada taxa de morbidade e morte associadas a este distúrbio (Zhang *et al.*, 2011; Zhou e Zhou, 2011).

1.2 Músculo-esquelético

O músculo-esquelético é o tecido mais abundante do organismo e desempenha um papel central no metabolismo e homeostasia humana. É bastante importante no balanço energético e o primeiro tecido a captar e armazenar glicose em resposta à estimulação com insulina (Cheng *et al.* 2006).

1.2.1 Fisiologia do músculo-esquelético

O músculo-esquelético é constituído por fibras musculares que são células largas, cilíndricas e multinucleadas que estão envolvidas por tecido conjuntivo e que se agrupam formando fascículos ou feixe de fibras (figura 1).

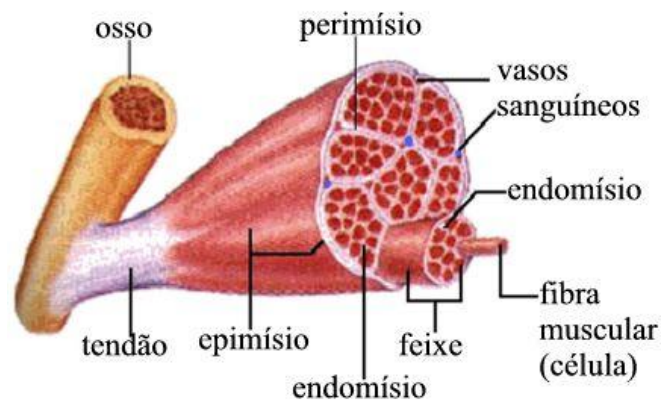


Figura 1: Ilustração de um corte transversal de músculo-esquelético.
(Imagem adaptada de grupomedveterinaria.wordpress.com)

A parte interior da fibra muscular é formada principalmente por miofibrilas de 1 a 2 μm de diâmetro, estas por sua vez são constituídas por filamentos de miosina e de actina dispostos lado a lado, que ao deslizarem uns sobre os outros permitem que ocorra a contração. A unidade estrutural do ciclo contráctil é designada de sarcómero (figura 2).

O sarcoplasma de uma fibra muscular é formado por organelos, inclusões e miofibrilas. O retículo sarcoplasmático é um organelo constituído por um sistema contínuo de túbulos limitados por membranas que se estendem por todo o sarcoplasma formando uma rede de malha fina em volta das miofibrilas. Os túbulos longitudinais distribuem-se por intervalos regulares ao longo das miofibrilas confluindo em canais, orientados transversalmente, de calibre maior designados de cisternas terminais. Pares paralelos de cisternas cursam transversalmente por entre as miofibrilas em relação íntima com um elemento de menor diâmetro, o túbulo T (invaginação do sarcolema). A associação destas três estruturas é designada de tríade do músculo-esquelético e é responsável pela libertação de cálcio, essencial no processo de contração (figura 2).

O músculo-esquelético é também um tecido bastante irrigado, os vasos sanguíneos passam pelo tecido conjuntivo e formam uma rede capilar em torno das fibras musculares onde ocorre a passagem dos nutrientes e das moléculas necessárias para o seu funcionamento.

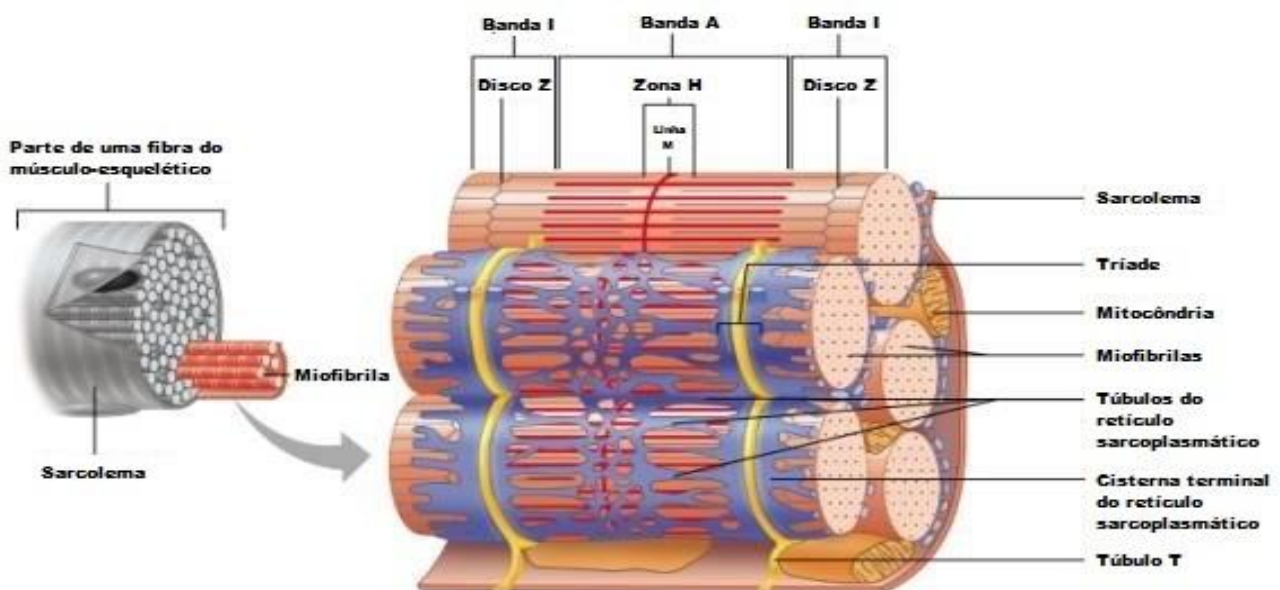


Figura 2: Ilustração de parte de uma fibra do músculo-esquelético. (Benjamin Cummings, uma impressão de Addison Wesley Longman Inc., 2001)

1.2.2 Funções fisiológicas do músculo-esquelético

O músculo-esquelético para além de ser responsável pelos movimentos voluntários e permitir o deslocamento dos organismos, é também um local de armazenamento de energia (armazena glicose na forma de glicogénio), sendo por isso um dos principais locais de captação de glicose. Esta pode ocorrer devido à estimulação por parte da insulina ou como resultado da contração. Uma redução da captação de glicose dependente de insulina é observada em condições de diabetes tanto *in vitro* como *in vivo* (Cheng *et al.*, 2006).

1.3 Fígado

O fígado desempenha um papel fundamental no nosso metabolismo. É um órgão importante na manutenção dos níveis energéticos pois têm a capacidade de controlar o armazenamento e a libertação de energia consoante as necessidades fisiológicas do organismo, passando de um estado anabólico para catabólico e vice-versa.

O estudo deste órgão é importante não apenas porque distúrbios na sua função influenciam o metabolismo da glicose e dos lípidos, influenciando a homeostasia de todo o corpo, mas também porque corresponde ao local responsável pela metabolização de fármacos e químicos tóxicos (Domitrovic *et al.*, 2010). É importante entender as alterações provocadas por estes para aperfeiçoar e desenvolver melhores estratégias terapêuticas no tratamento de certas doenças como a diabetes tipo 2.

1.3.1 Fisiologia do fígado

O fígado é a maior glândula do corpo humano, com um peso aproximadamente de 1,5 quilos num adulto. Funciona como glândula exócrina e endócrina, estando envolvido no metabolismo de diversas moléculas, tanto a nível de armazenamento como de produção.

Está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, por baixo do diafragma e protegido pelas costelas inferiores. Envolvido por uma fina membrana fibrosa, cápsula de Glisson, e pelo peritoneu, apresenta uma cor vermelha escura com uma consistência mole e superfície lisa. Na sua constituição podem-se distinguir dois lóbulos, sendo o direito de maiores dimensões e estando separado do esquerdo por uma prega do peritoneu denominada de ligamento falciforme (figura 3).

Na parte inferior, através de um sulco, hilo hepático, penetram no fígado dois vasos: a artéria hepática e a veia porta hepática, que transportam o sangue vindo do tubo digestivo e do baço. Estes vasos ramificam-se no interior do fígado formando uma rede complexa de capilares sanguíneos que entram em contacto com as células hepáticas, hepatócitos, permitindo o intercâmbio de substâncias, terminando nas veias supra-hepáticas que emergem na parte superior do fígado e levam o sangue para a veia cava inferior (figura 3).

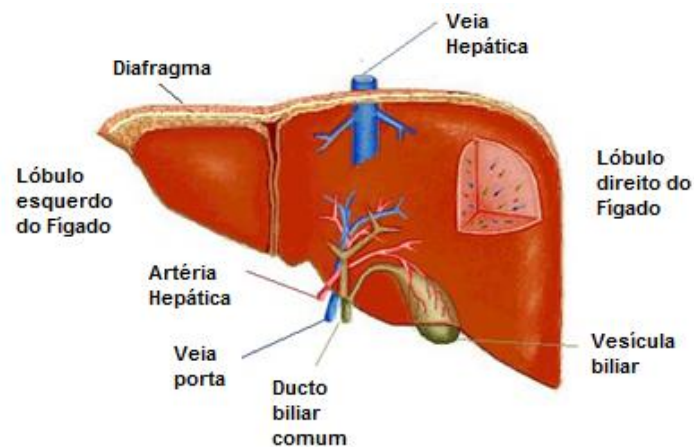


Figura 3: Ilustração de um corte longitudinal do fígado.
(Adaptado do site www.dermaharmony.com)

1.3.2 Funções fisiológicas do fígado

O fígado está envolvido em diversas funções relacionadas com o metabolismo dos hidratos de carbono, dos lípidos e das proteínas; armazenamento de glicogénio, de vitaminas e ferro e metabolização de drogas. Assim, funções de armazenamento, destoxificação, proteção, síntese da bÍlis, produção de albumina e formação da ureia são algumas das inúmeras funções desta glândula.

1.4 Transporte de glicose

O transporte de glicose através das membranas celulares desempenha um papel chave na sua regulação e controlo do metabolismo energético. A manutenção de uma concentração de glicose sanguínea relativamente constante é importante para o metabolismo cerebral e permite também a sua utilização e armazenamento nos tecidos periféricos (Brown, 2000).

O transporte de glicose é mediado por proteínas transportadoras. O rápido metabolismo da glicose dentro da célula cria um gradiente de concentração através da membrana plasmática permitindo um transporte sem dispêndio energético – difusão facilitada (Brown, 2000).

Os transportadores de glicose abrangem uma família de proteínas (Brown, 2000; Olson e Persin, 1996) com 12 domínios membranares com locais de ligação de ligandos tanto internos como externos, domínios citoplasmáticos N e C-terminal e um local de glicosilação localizado num dos *loops* extracelulares. Existem 4 transportadores de glicose bem definidos nesta família designados de GLUT 1-4 (figura 4) (Mueckler, 1994; Olson e Persin, 1996; Brown, 2000).

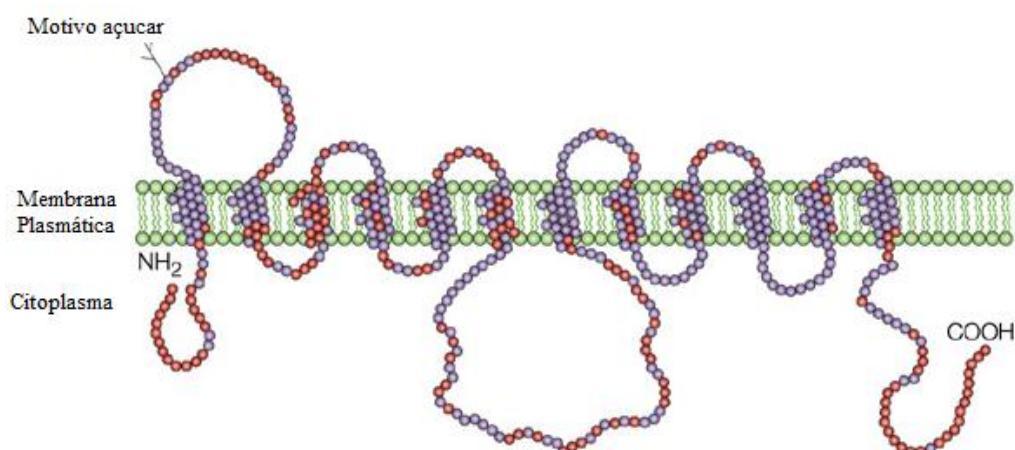


Figura 4: Representação esquemática da família de proteínas GLUT.
(Adaptado de Bryant *et al.*, 2002)

O GLUT4 é o transportador de glicose sensível a insulina mais abundante na membrana das células dos tecidos insulino-dependentes como o músculo-esquelético e tecido adiposo (James *et al.*, 1989; Brown, 2000). Nestes tecidos, o GLUT4 é responsável pela maioria da captação de glicose, embora existam outros transportadores de glicose. Em condições basais (ausência de estímulos), a densidade de transportadores GLUT4 na membrana celular é relativamente baixa e a maioria dos transportadores estão presentes na membrana de vesículas citoplasmáticas. Após estimulação pela insulina, estes transportadores são translocados para a membrana celular aumentando a captação da glicose (Cushman e Wardzala, 1980; Suzuki e Kono, 1980; Brown, 2000).

O transporte de glicose, é o passo limitante na velocidade do metabolismo da glicose, e pode ser ativado nos tecidos periféricos por duas vias distintas. Uma é estimulada pela insulina através do substrato do recetor da insulina (IRS-1) e do fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-cinase), a outra pela contração muscular/exercício físico através da ativação da proteína cinase ativada pelo AMP (AMPK) (Krook *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2006). Ambas as vias aumentam a fosforilação dos componentes da família das MAPK (cinase das proteínas ativadoras de mitogénese) (Goodyear *et al.*, 1996; Widegren *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2006), e promovem a translocação de vesículas contendo os transportadores GLUT4 para a membrana plasmática aumentando a captação da glicose

1.4.1 Via da insulina

A insulina através da ligação ao seu recetor regula a captação de glicose para os tecidos (Li *et al.*, 2004). Assim, a ligação da insulina aos recetores no fígado, nos músculos ou tecido adiposo aciona várias vias intracelulares que causam o aumento da síntese de glicogénio e captação de glicose, assim como a diminuição da libertação da glicose pelo fígado e músculo (Zhang H. *et al.*, 2010).

O recetor da insulina pertence à família dos recetores de fatores de crescimento com atividade de tirosina cinase intrínseca (Virkamaki *et al.*, 1999). É um heterotetrâmero constituído por duas subunidades α , e duas subunidades β com atividade tirosina cinase (Kasuga *et al.*, 1983; Virkamaki *et al.*, 1999; Saini, 2010). A

ligação de insulina à subunidade α do recetor da insulina leva a ativação da tirosina cinase da subunidade β promovendo a autofosforilação desta. Para que haja a amplificação da atividade de cinase é necessário ocorrer a fosforilação de três resíduos de tirosina (White *et al.*, 1988; Saini, 2010). Este processo resulta na ativação da cinase do recetor e na fosforilação da tirosina de uma família de proteínas designadas de substratos do recetor da insulina, IRS (figura 5).

Após a fosforilação da tirosina do IRS, esta interage com proteínas como a subunidade p58 da PI3-cinase (figura 5) (Li *et al.*, 2004). A PI3-cinase é uma cinase lipídica, constituída por uma subunidade reguladora, responsável pela ligação das proteínas IRS, e uma subunidade catalítica responsável pela fosforilação dos fosfatidilinositois encontrados nas membranas celulares (Virkamaki *et al.*, 1999).

A ativação da PI3-cinase produz fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Pensa-se que estes atuam como segundos mensageiros para algumas respostas biológicas da insulina ao ligarem-se a cinases serina/treonina da AKT/PKB (proteína cinase B) e ao seu ativador cinase-1 dependente de fosfoinositídeos, PDK1 (figura 5) (Cohen *et al.*, 1997; Coffey *et al.*, 1998; Virkamaki *et al.*, 1999).

A ativação da PI3-cinase leva à estimulação/ativação da AKT (Li *et al.*, 2004) que por sua vez promove a translocação das vesículas, contendo os transportadores de glicose (GLUT4), para a membrana plasmática permitindo a captação de glicose (figura 5) (Kupriyanova e Kandror, 1999; Pessin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000; Morino *et al.*, 2006; Saini, 2010).

Anormalidades no recetor e nas vias de sinalização a jusante são de extrema importância para o desenvolvimento de resistência à insulina associada à diabetes *mellitus* tipo 2 e à síndrome metabólica (Taylor *et al.*, 1994; Stumvoll *et al.*, 2005). Indivíduos com resistência à insulina têm ausência ou redução da expressão do recetor da insulina nos tecidos periféricos, particularmente músculo, fígado e tecido adiposo (Foti *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2009). Os principais genes que podem estar implicados na patogénese da insulino-resistência são: o gene do recetor de insulina, os genes do IRS-1 e -2, o gene da PI3-cinase e o gene do GLUT 4.

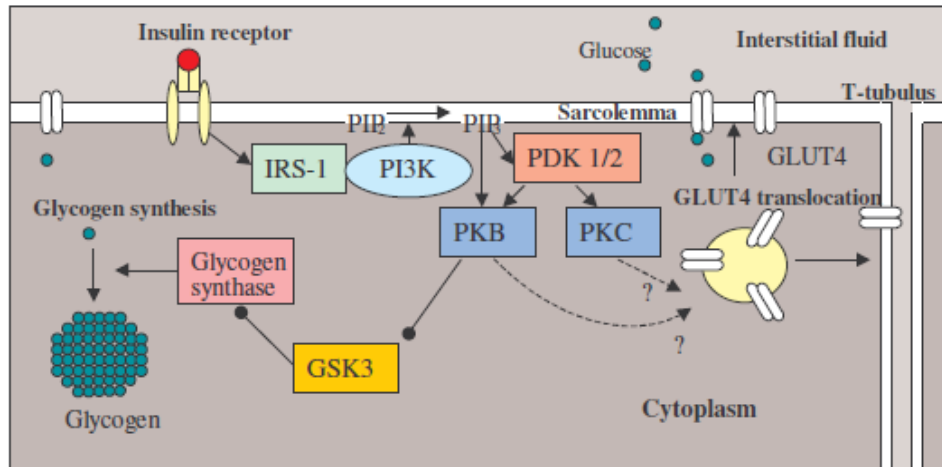


Figura 5: Via de sinalização da insulina que conduz à estimulação da captação de glicose e à síntese de glicogênio. (Retirado de Derave, W., 2000)

1.4.2 Via da AMPK

A AMPK é uma enzima heterotrimérica que é ativada por regulação alostérica e fosforilação (Hardie, 2003; Cheng *et al.*, 2006). Funciona como regulador metabólico que fosforila proteínas chave incluindo enzimas envolvidas no metabolismo de lípidos, oxidação de ácidos gordos e captação de glicose (Cheng *et al.*, 2006). Pertence à família das proteínas cinases sensíveis a metabolitos e atua não só como sensor energético mas também como molécula sinalizadora em células musculares ao monitorizar os níveis energéticos da célula como a razão entre o AMP (monofosfato de adenosina) e o ATP (trifosfato de adenosina) (Ma *et al.*, 2010).

Esta cinase é ativada após depleção de ATP, ou mais precisamente, quando ocorre o aumento da razão AMP:ATP dentro da célula, ajustando as taxas de consumo de ATP, e respectivas reações anabólicas e catabólicas (Carling, 2004). A longo prazo, a ativação da AMPK altera tanto a expressão de genes (Yang *et al.*, 2001; Carling, 2004) como a expressão de proteínas (Winder *et al.*, 2000; Fryer *et al.*, 2002; Carling, 2004). Embora as consequências fisiológicas destes efeitos não sejam completamente compreendidas, parece provável que estejam relacionadas com a regulação do metabolismo energético global (Carling, 2004). A AMPK também parece estar envolvida na regulação periférica da resistência à insulina e controlo glicémico (Leff, 2007).

Para além da alteração da razão da AMP:ATP, que pode ser provocada por estímulos fisiológicos e patológicos (exercício prolongado, envenenamento metabólico, choque por calor, *stress* oxidativo, hipoxia, isquemia ou privação de nutrientes) que levam ao aumento do rácio (figura 6), outros estímulos como as estatinas, o peroxinitrito, a adiponectina, a leptina, a metformina e a calmodulina dependente da proteína cinase II mostraram também a ativação da AMPK independentemente das mudanças no rácio AMP:ATP (figura 6) (Li e Keaney Jr, 2010).

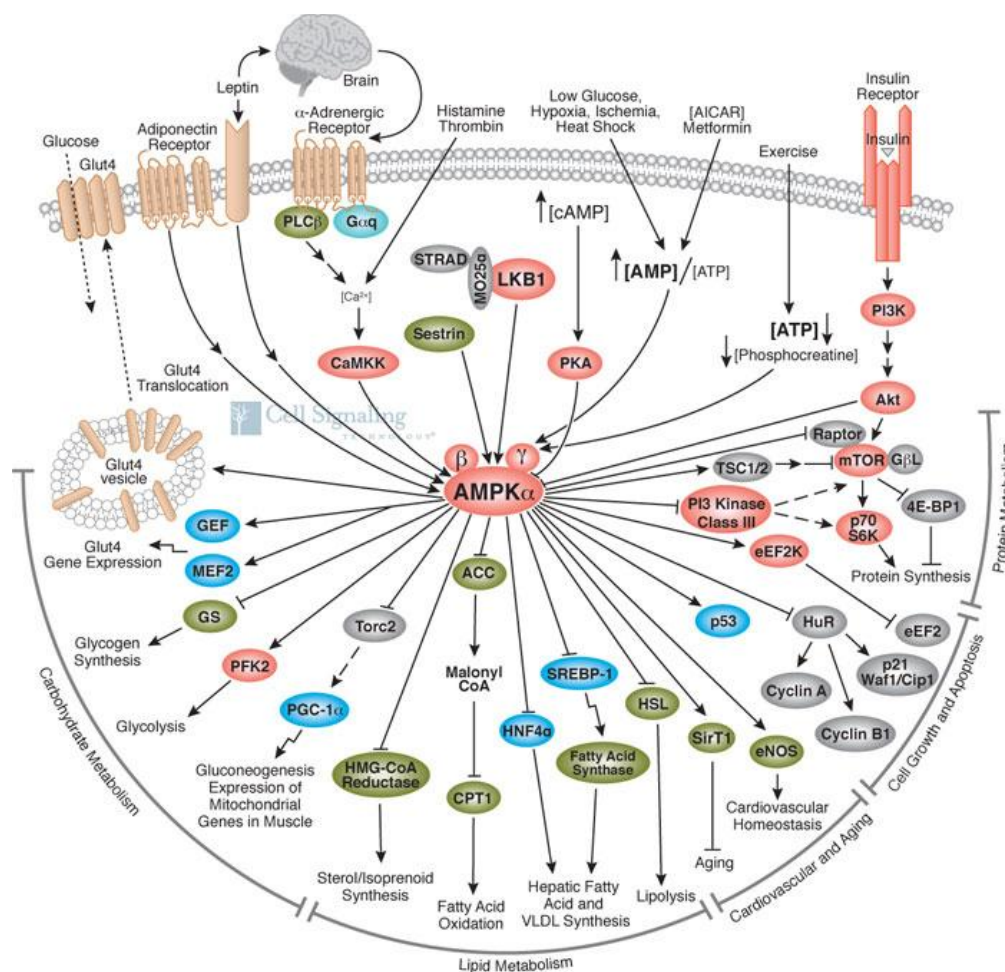


Figura 6: Via de sinalização da AMPK.

AMPK atua em diversas moléculas associadas ao metabolismo dos hidratos de carbono, dos lípidos e das proteínas. Tem também relevância no envelhecimento e fisiologia cardiovascular, bem como, no crescimento e apoptose celular. Alguns exemplos da ação da AMPK são o bloqueio do alvo do complexo 1 da rapamicina em mamíferos (mTOR), fator de crescimento que contribui para a resistência à insulina, da ACC, acetil CoA carboxilase que produz malonil CoA envolvida na síntese de ácidos gordos e da HMGCoA redutase, enzima chave para a síntese de colesterol. Por outro lado, a AMPK aumenta a atividade da eNOS (sintase de monóxido de azoto endotelial) aumentando a produção de óxido nítrico que está relacionado com o relaxamento endotelial, bem como aumenta a expressão dos transportadores de glicose 4 (GLUT4). (Imagem retirada de flipper.diff.org)

A AMPK é constituída por uma subunidade catalítica α e duas subunidades reguladoras β e γ . Existem duas isoformas da subunidade α (AMPK α 1 e AMPK α 2) (Carling, 2004; Li e Keaney Jr, 2010; Ma *et al*, 2010). A subunidade α contém uma serina/treonina com características conservadas dentro da superfamília das proteínas cinases (Carling, 2004), uma região de 150 resíduos de aminoácidos no terminal C necessária para a associação com a subunidade β e γ e vários resíduos que podem ser fosforilados tanto *in vitro* como *in vivo*, destacando-se o resíduo Thr172 cuja fosforilação é essencial para a atividade da AMPK. A subunidade β funciona como elo de ligação das sub-unidades α e γ (Woods *et al.*, 1996; Carling, 2004). Por sua vez a subunidade γ possui quatro domínios sintase da cistationina β (CBS), necessários para a ligação do AMP (figura 7) (Carling, 2004).

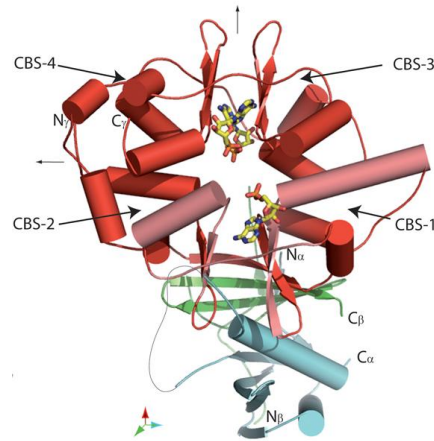


Figura 7: Estrutura da AMPK.
(Imagem retirada de nimr.mrc.ac.uk)

A via da insulina relaciona-se com a via da AMPK através da AKT. A ativação da AKT diminui a fosforilação da AMPK no resíduo Thr172 (Kovacic *et al.*, 2003; Carling, 2004; Lim *et al.*, 2010).

Devido ao seu papel na manutenção do equilíbrio da energia no interior das células, a AMPK pode desempenhar um papel importante na proteção do organismo contra doenças metabólicas como a diabetes *mellitus* tipo 2 e a obesidade (Carling, 2004). Diversos estudos mostraram que a ativação da AMPK no músculo-esquelético melhorou o metabolismo da glicose (Leff, 2007; Steinberg e Jorgensen, 2007) e que reduziu a hiperglicemia em animais diabéticos devido ao aumento da captação da

glicose no músculo-esquelético. No fígado, a ativação da AMPK reduziu a produção de glicose pois levou à supressão da transcrição de genes chave na via da gliconeogénese (Lochhead *et al.*, 2000). Para além disso sabe-se que a AMPK fosforila e inibe a atividade da ACC, reduzindo a concentração intracelular de Malonil-CoA, o que causa a redução da biossíntese de ácidos gordos e o aumento da oxidação dos ácidos gordos (Leff, 2007).

1.5 Resistência à insulina

A insulina é uma molécula pleiotrópica que regula a captação de aminoácidos, a síntese de proteínas, a proteólise, a lipólise no tecido adiposo, a atividade de lipoproteínas lípase, a secreção de lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL), a captação de glicose no tecido adiposo e músculo-esquelético, a síntese de glicogénio no fígado e músculo-esquelético e a produção endógena de glicose. Indivíduos insulino-resistentes apresentam um metabolismo de glicose alterado, com níveis de glicose em jejum elevados e/ou hiperglicemia, redução na ação da insulina após a administração da glicose e/ou diminuição na supressão da produção de glicose endógena (Cornier *et al.*, 2008).

Para além dos fatores genéticos, também os fatores ambientais parecem estar envolvidos na ocorrência da resistência à insulina. A combinação da obesidade, inatividade física e consumo de dietas aterogénicas aumenta a prevalência de casos de insulino-resistência (Cornier *et al.*, 2008).

Sob o ponto de vista metabólico, a insulino-resistência evidencia-se nas células hepáticas, musculares e adiposas. O músculo e o tecido adiposo são os principais órgãos responsáveis pela utilização periférica da glicose em condições pós-prandiais; assim a diminuição da produção dos transportadores de glicose GLUT4, responsáveis pela captação de glicose e defeitos de atividade da glicogénio sintetase muscular, contribuem para a hiperglicemia pós-prandial. O fígado é o principal responsável pela produção de glicose em condições de jejum; assim a insuficiente inibição da glicogénólise e gliconeogénese hepática, aparentemente em relação com alterações da glicocinase

hepática, contribuem para a hiperglicemia de jejum. O aumento relativo dos níveis da glicemia e dos ácidos gordos circulantes que ocorrem nessas circunstâncias podem contribuir para a insulino-resistência e para a lesão progressiva da célula β -glico- e lipotóxica (Saini, 2010).

Para manter a homeostase da glicemia é necessário o desenvolvimento de um hiperinsulinismo mantido, o que requer a capacidade adaptativa e de reserva da célula β ; quando esta falha, em geral ao fim de algumas décadas, surge então a hiperglicemia e a diabetes (Cornier *et al.*, 2008). A resposta secretora da insulina diminui, o que conduz a uma diminuição da concentração de insulina no plasma resultando no aumento da produção hepática de glicose e hiperglicemia em paralelo (Lillioja *et al.*, 1993).

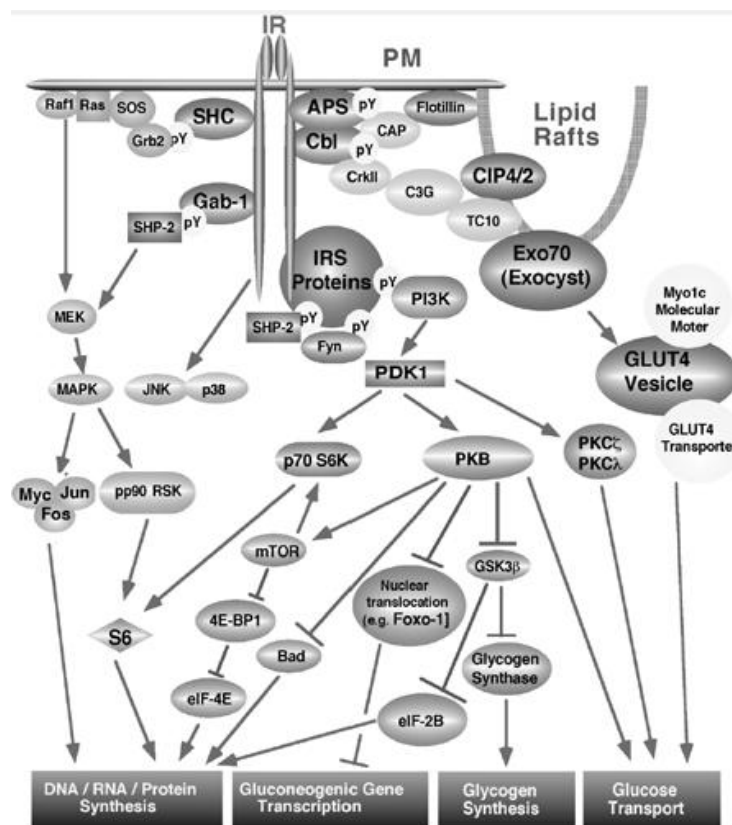


Figura 8: Via de sinalização da insulina e respetivas funções. (Retirado de msdlatinaamerica.com)

A insulino-resistência define-se como uma situação com uma resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena. A nível celular, a resistência à insulina define a incapacidade da via de sinalização da insulina desempenhar as suas funções que estão envolvidas em múltiplos aspetos metabólicos e mitogénicos da sua função

celular (Ginsberg, 2000; Saini, 2010). Diversas evidências têm demonstrado que defeitos no transporte de glicose são responsáveis pela resistência à insulina observada em diabetes *mellitus* tipo 2. A insulino-resistência deve-se a defeitos na regulação do transportador de glicose 4, incluindo alterações na expressão e translocação de GLUT4; alteração nos padrões temporais e espaciais das moléculas sinalizadoras e/ou defeitos na via de sinalização da insulina (figura 8) (Yaworsky *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2007), como ausência ou diminuição da expressão do recetor da insulina nos tecidos periféricos (Foti *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2009), entre outros.

1.5.1 Causas possíveis relacionadas com o desenvolvimento da resistência à insulina

1.5.1.1 PI3-cinase

A família das PI3-cinases é constituída por várias enzimas estruturalmente relacionadas com diferentes modos de ativação e regulação. Pode ser dividida em três classes funcionais: I, II e III. A primeira existe na forma de heterodímeros, consistindo numa subunidade reguladora p58 associada a uma subunidade catalítica p110 (Saini, 2010). A regulação da atividade da PI3-cinase envolve um equilíbrio entre os monómeros p58 livres e os heterodímeros p58-p110, sendo estes últimos os responsáveis pela atividade da PI3-cinase (Mauvais-Jarvis *et al.*, 2000; Ueki *et al.*, 2003; Saini, 2010). Os monómeros p58 e os heterodímeros competem pelos mesmos locais de tirosina fosforilada das proteínas IRS, por isso um desequilíbrio pode causar a diminuição ou aumento da atividade da PI3-cinase (Saini, 2010).

Alguns estudos demonstraram que uma inibição da PI3-cinase leva à inibição da captação de glicose estimulada pela insulina com concomitante inibição da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (Okada *et al.*, 1994; Virkamaki *et al.*, 1999). A supressão da PI3-cinase inibe também outras funções celulares como a fosforilação da AKT, a síntese de ácidos gordos, proteínas e DNA (Alessi e Downes, 1998; Virkamaki *et al.*, 1999).

Como altera a captação de glicose e o metabolismo celular, esta cinase pode potencialmente levar ao desenvolvimento de resistência à insulina.

1.5.1.2 PKC

A proteína cinase C (PKC) é uma superfamília composta por várias isoformas envolvidas em múltiplos processos de sinalização celular. O aumento de metabólitos de lípidos como o diacilglicerol e acil CoA leva a uma maior ativação de certas isoformas da PKC, demonstrado através de estudos com infusões lipídicas, em ratos e humanos, que ativaram a PKC θ e a PKC δ induzindo resistência à insulina nestes (Boden e Shulman, 2002; Itani *et al.*, 2002; Saini, 2010). Para além disso, a PKC mostrou ser um possível candidato para a fosforilação de serinas do recetor da insulina (Virkamaki *et al.*, 1999; Morino *et al.*, 2006; Saini, 2010), resultando em defeitos na sinalização da insulina e conseqüentemente no aparecimento de resistência à insulina (Saini, 2010).

1.5.1.3 Aumento da fosforilação de serinas nas proteínas IRS

O IRS-1 tem mais de 70 locais de fosforilação de serinas possíveis. A fosforilação destas regula negativamente a sinalização do IRS (Morino *et al.*, 2006). Foi anteriormente descrito que o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) diminui a sinalização de insulina ao induzir a fosforilação da serina do IRS-1 (figura 9) (Virkamaki *et al.*, 1999).

A fosforilação de serinas pode levar a dissociação entre o recetor da insulina e o IRS e/ou dissociação do IRS-1 da PI3-cinase, prevenindo a ativação da PI3-cinase (Li *et al.*, 1999; Moeschel *et al.*, 2004; Morino *et al.*, 2006; Saini, 2010) ou aumentando a degradação do IRS-1 (Itani *et al.*, 2002; Morino *et al.*, 2006; Saini, 2010).

Esta fosforilação de serinas diminui a fosforilação da tirosina do IRS, reduzindo os efetores posteriores (Virkamaki *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Saini, 2010) e consequentemente comprometendo a via de sinalização da insulina.

O mecanismo de ativação das cinases serina/treonina *in vivo* não é claro, no entanto, parece ser secundário ao aumento intracelular de cadeias longas de acil CoAs e diacilglicerol (Yu *et al* 2002; Morino *et al*, 2006).

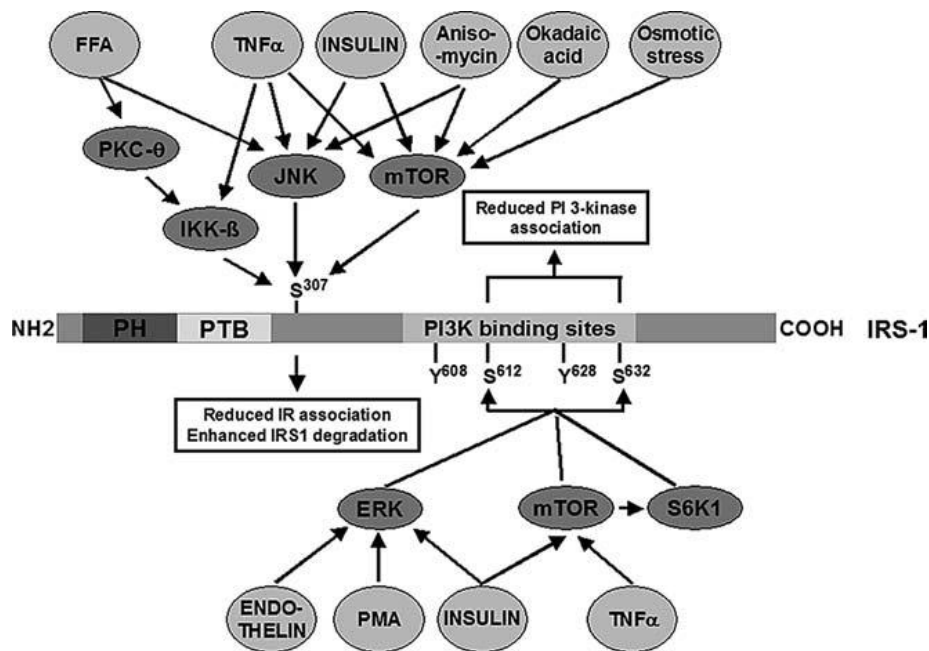


Figura 9: Representação do gene do IRS-1. São evidenciados os diferentes locais de fosforilação de serinas e tirosinas assim como as moléculas que provocam essa fosforilação. A fosforilação do IRS-1 na Ser307, Ser612 e Ser632 regula negativamente a função do IRS-1. IRS-1 contém domínios PH e PTB (domínio de ligação a fosfotirosina) no terminal N que ligam o IRS ao recetor da insulina. O domínio do terminal-C contém uma série de motivos de fosforilação de tirosinas, que são diretamente fosforilados pelo recetor da insulina. A fosforilação da Tyr608 e Tyr628, por exemplo, gera locais de ancoragem para a PI3-cinase. O IRS-1 também contém locais de fosforilação de serinas como a Ser621 e Ser632. A fosforilação da Ser370 desacopla o IRS-1 do recetor da insulina, diminuindo a fosforilação da tirosina e aumentando a sua degradação; enquanto que a fosforilação da Ser612 e Ser632, localizadas perto dos resíduos tirosina está envolvida na ligação com PI3-cinase, podendo reduzir a associação entre o IRS-1 e a PI3-cinase. (Retirado de Gual *et al.*, 2005)

1.5.1.4 Ácidos gordos livres

Uma elevada concentração de ácidos gordos circulantes, principalmente derivados das reservas de triglicérides do corpo, contribui para o aparecimento de resistência à insulina (Eckel, 1989; Jensen *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2001; Kong *et al.*, 2009). Experiências em modelos animais mostram que infusões de emulsões lipídicas, mesmo de curta duração, podem resultar em resistência à insulina (Dresner *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2009).

O aumento intracelular de metabolitos derivados de ácidos gordos, como o diacilglicerol, acil CoAs ou ceramidas ativa uma cascada de serinas/treoninas levando a fosforilação de locais serina/treonina do IRS. Estas formas fosforiladas nos resíduos de serina impedem a interação do IRS com a PI3-cinase diminuindo a ativação do transporte de glicose e outros eventos desencadeados pela interação do IRS com a PI3-cinase, como a translocação dos transportadores de glicose GLUT4 (figura 10) (Shulman, 2000; Saini, 2010). Para além disso, os ácidos gordos competem com a glicose para a oxidação de substratos no músculo-esquelético (Shulman 2000).

O aumento de ácidos gordos livres no plasma diminui a captação de glicose estimulada pela insulina, enquanto a diminuição do conteúdo de lípidos no plasma melhora a atividade da insulina em células do músculo-esquelético, adipócitos e fígado (Moller, 2001; Saini, 2010) demonstrando a relação entre os ácidos gordos e a insulino-resistência.

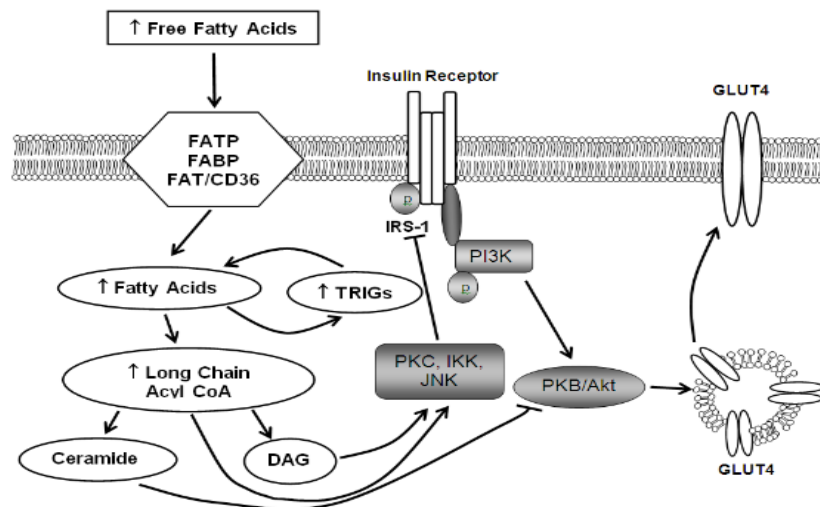


Figura 10: Mecanismo proposto para o desenvolvimento de resistência à insulina induzida pela dislipidemia.

O aumento da concentração de ácidos gordos livres circulantes aumenta a sua absorção. A acetil-CoA com cadeias longas não oxidadas pode ser utilizada em vias não-oxidantes levando à geração de triglicerídeos, diacilglicerol (DAG) e ceramidas. Ambos os metabolitos lipídicos têm sido implicados na etiologia da resistência à insulina devido à ativação de moléculas como a PKC e a cinase do fator de transcrição c-Jun (JNK).

(Retirado de Eugene *et al.*, 2012)

1.5.1.5 Forkhead Box Protein O-1

Estas proteínas estão envolvidas na regulação da expressão de genes envolvidos na gliconeogénese de uma maneira dependente da insulina e na resistência à insulina *in vivo* (Nakae *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004; Saini, 2010). Forkhead box 1 (Foxo1) é fosforilada pela AKT, que é estimulada pela insulina. A diminuição da atividade da AKT resulta na diminuição da fosforilação das proteínas Foxo, levando à entrada destas no núcleo onde ativam a transcrição de genes envolvidos na gliconeogénese (Hall *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2003; Saini, 2010) aumentando a produção de glicose.

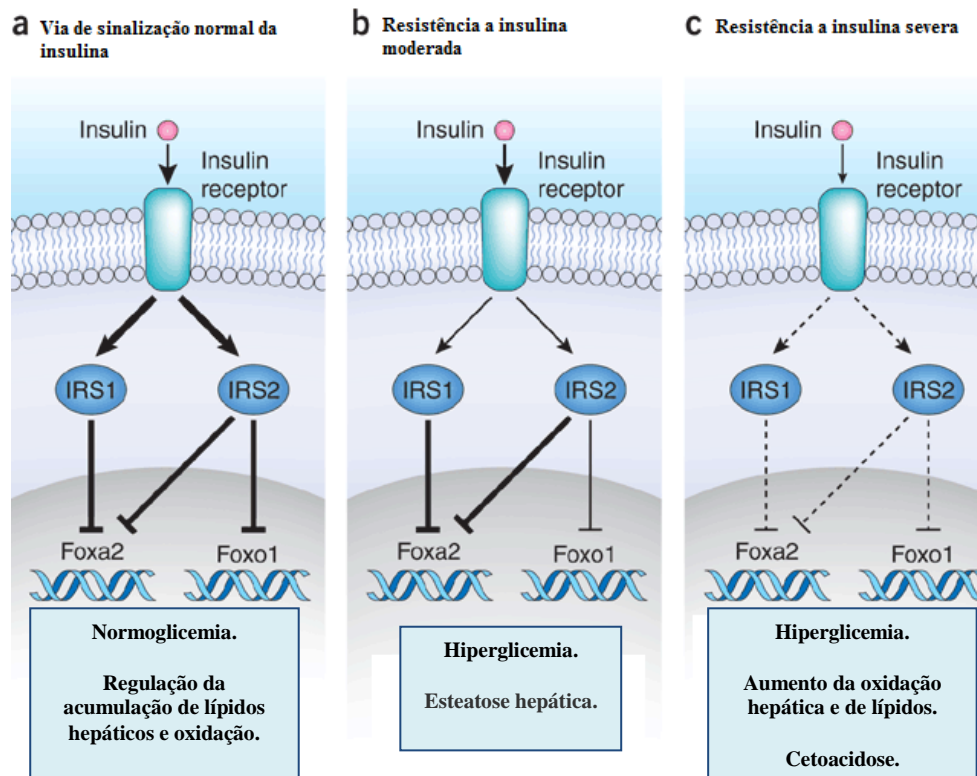


Figura 11: Representação da regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios através de fatores de transcrição *forkhead*. **(a)** Em condições normais, a via da insulina regula a Foxo1 e Foxo2, controlando a glicemia e o balanço entre oxidação de lipídios e acumulação de lipídios hepáticos. **(b)** Na resistência à insulina moderada, ocorre a redução da atividade da via da insulina levando à ativação da Foxo1, que aumenta a hiperglicemia e a gliconeogênese. No entanto, a Foxo2, como é mais sensível a insulina, continua a reprimir, resultando em diminuição da oxidação de lipídios e esteatose hepática. **(c)** Na resistência à insulina severa, a via da insulina está fracamente comprometida e não é ativada. A Foxo1 e a Foxo2 encontram-se ativas aumentando a gliconeogênese, a hiperglicemia e os níveis de oxidação de lipídios, levando a cetoacidose.

(Imagem da adaptada de nature.com)

1.5.1.6 PTP1B

PTP1B, proteína tirosina fosfatase 1B, é um regulador negativo da sinalização da insulina que interage com o recetor da insulina e catalisa a sua desfosforilação. Em pacientes diabéticos, o aumento da atividade da PTP1B acompanha a redução da sensibilidade à insulina (Chen *et al.*, 2010) podendo estar envolvido no desenvolvimento da insulino-resistência.

1.5.2 Resistência à insulina no fígado

O aumento do fluxo de ácidos gordos livres compromete a ação da insulina hepática em vários modelos estudados (Bergman *et al.*, 2007). Isto inclui o aumento da libertação de glicose hepática, a síntese de citocinas pro-inflamatórias e alterações no metabolismo de lipoproteínas (Cornier *et al.*, 2008).

A insulina em situações normais aumenta a expressão de genes que expressam enzimas chave na biossíntese de triglicerídeos (Gonzalez-Baro *et al.*, 2007), mas também reduz a produção e secreção de triglicerídeos VLDL e apoproteína B, um efeito atribuído à redução da lipólise no tecido adiposo (Lewis *et al.*, 1993).

No fígado de pacientes insulino-resistentes, o fluxo de ácidos gordos livres é elevado, a síntese e armazenamento de triglicerídeos está aumentada e o excesso de triglicerídeos é secretado como VLDL (Lewis e Steiner, 1996). A dislipidemia associada à resistência à insulina é uma consequência direta do aumento da secreção de VLDL no fígado (Ginsberg *et al.*, 2005; Cornier *et al.*, 2008).

1.5.3 Resistência à insulina no músculo-esquelético

O defeito predominante na ação da insulina neste tecido é um efeito inibitório no transporte de glicose estimulado pela insulina devido ao aumento de ácidos gordos livres (Boden *et al.*, 1994; Roden *et al.*, 1999). É colocada a hipótese que a acumulação de triglicerídeos no músculo desempenha um papel direto na etiologia da resistência à insulina (McGarry, 2002).

Existem evidências que correlacionam inversamente a sensibilidade da insulina do organismo com o conteúdo de triglicerídeos (Pan *et al.*, 1997; McGarry, 2002), que pode ser utilizado como um marcador de outros mediadores da resistência à insulina como as ceramidas (Summers, 2006; Cornier *et al.*, 2008).

Estratégias que reduzam a sobrecarga de lípidos no músculo e no fígado podem ser benéficas na redução da insulino-resistência em pacientes com diabetes ou pré-diabetes.

1.6 Berberina

A berberina é um alcalóide isoquinolina do tipo protoberberina que pode ser encontrado nas raízes, rizomas e casca de caules de diversas espécies de plantas como a *Coptis chinensis* Franch, *Coptis japonica* Makino, *Berberis vulgaris* L., *Hydrastis canadensis* L. e *Berberis aquifolium* Pursh (figura 12) (Imanshahidi e Hosseinzadeh, 2008; Domitrovic *et al.*, 2010).

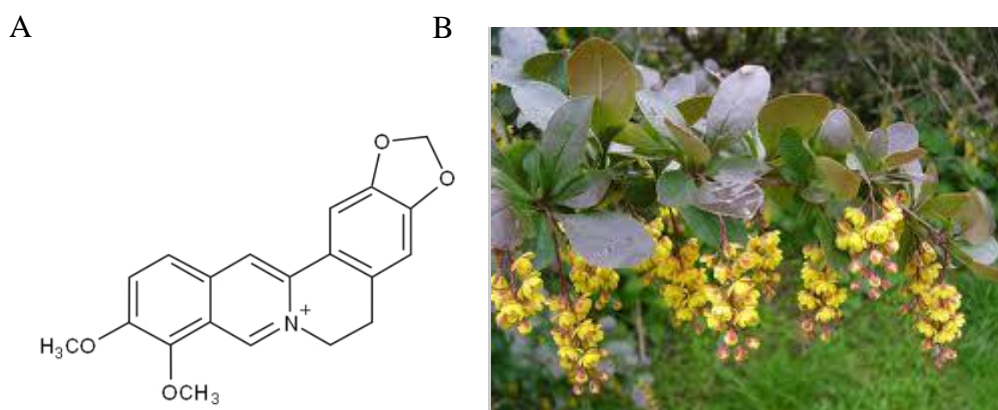


Figura 12: (a) Estrutura molecular da berberina. (b) *Berberis vulgaris* L.

Possui um grande espectro de aplicações clínicas sendo utilizada no tratamento de diarreias bacterianas, infecções parasíticas nos intestinos, doenças cardiovasculares e inflamação (Cheng *et al.*, 2006). A berberina começou a ser usada no tratamento de diabetes tipo 2 na China em 1980, quando o seu efeito hipoglicémico foi acidentalmente descoberto no tratamento da diarreia em pacientes diabéticos. Desde essa altura, um largo número de ensaios clínicos e experiências em animais têm sido efetuadas para demonstrar o efeito benéfico deste alcalóide (Chen e Xie, 1986; Gao *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2007).

1.6.1 Efeitos gerais da berberina no metabolismo da glicose

Estudos anteriores mostraram que a berberina diminui a glicose sanguínea, altera a sensibilidade à insulina e reduz o peso corporal, tanto em modelos de ratos com diabetes tipo 2 induzida pela dieta como manipulados geneticamente (Yin *et al.*, 2012). Em ratos obesos induzidos por uma dieta gorda, a berberina diminui a glicemia do jejum e pós-prandial a insulina em jejum, o modelo de avaliação da homeostasia (HOMA-IR) e o peso corporal (Lee *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2012).

1.6.2 Efeitos gerais da berberina no metabolismo dos lípidos

Foi demonstrado que a berberina melhorou o metabolismo dos lípidos tanto em animais como humanos. Dois ensaios clínicos mostraram que a berberina diminui os triglicerídeos, o colesterol no soro e os níveis de colesterol contido na lipoproteína de muita baixa densidade (LDL-C) em pacientes com dislipidemia (Kong *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2012). Em ratos obesos induzidos por uma dieta gorda, a berberina diminuiu os níveis de triglicerídeos plasmáticos (Leng *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2012).

1.6.3 Efeitos da berberina no fígado

Um estudo recente mostrou que a berberina diminuiu a glicose sanguínea em jejum por inibição direta dos genes da gliconeogénese, como a carboxixinase da fosfoenolpiruvato (PEPCK) e glicose 6 fosfatase (G6Pase) no fígado. Teve também um efeito benéfico na esteatose hepática devido à inibição da expressão da sintase de ácidos gordos (FAS) (Yin *et al.*, 2012).

Outros estudos em modelos de roedores obesos e diabéticos mostraram uma redução do peso do fígado, uma diminuição dos níveis de triglicerídeos hepáticos e

plasmáticos e uma diminuição do colesterol (Zhou *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2012).

1.6.4 Efeitos da berberina no músculo-esquelético

A nível muscular, estudos prévios descreveram que a berberina melhorou a atrofia muscular, aumentou o armazenamento de glicogénio e diminuiu o conteúdo de triglicéridos em músculos-esqueléticos de ratos diabéticos tipo 2, de uma maneira independente da atividade da insulina (Yin *et al.*, 2012).

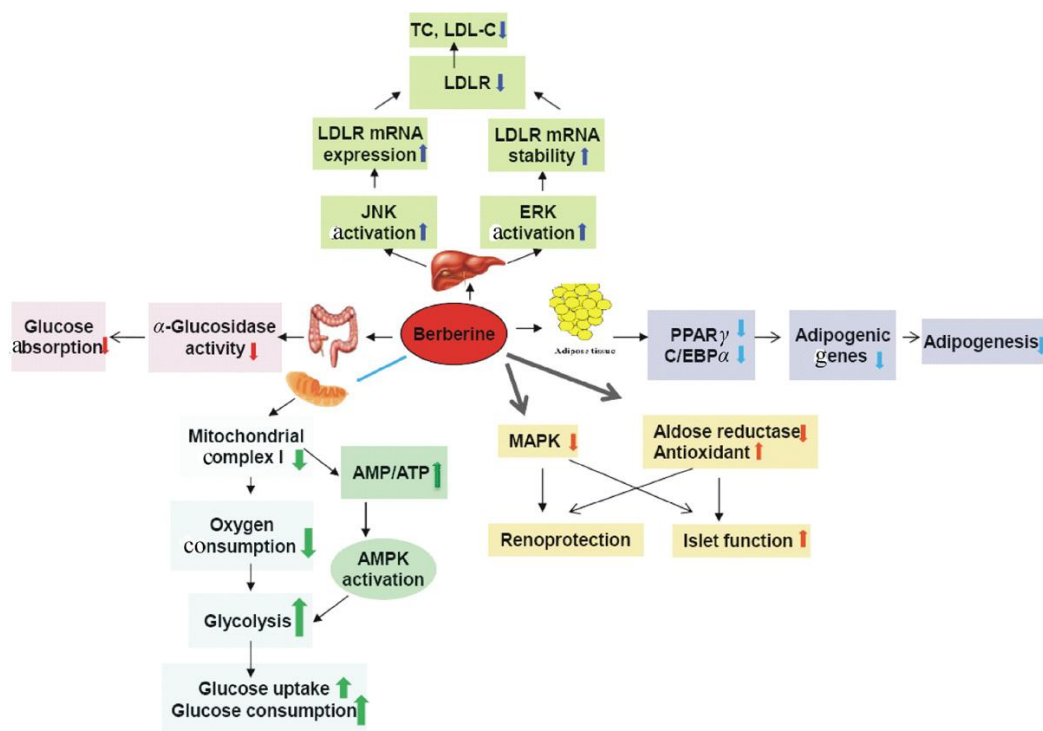


Figura 13: Mecanismo da berberina na regulação do metabolismo.

(1) Aumenta a captação de glicose através da indução da glicólise, devido à inibição da respiração aeróbica que leva a ativação da AMPK; (2) suprime a adipogênese através da inibição da função do receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPARγ) e *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP); (3) diminui a absorção de glicose intestinal pela inibição da glicosidase-α; (4) alivia a nefropatia diabética e melhora a função dos ilhéus, através da inibição da aldose redutase e cinase das proteínas ativadoras de mitogênese (MAPK); (5) regula positivamente a expressão do receptor das lipoproteínas de baixa densidade (LDLR) através do aumento do mRNA do mesmo, que está relacionado com a ativação das vias da cinase reguladora de sinais extracelulares (ERK) e cinase do fator de transcrição c-Jun (JNK). (Retirado de Yin *et al.* 2012).

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Os sais e os solventes orgânicos utilizados possuem o mais alto grau de pureza analítica e foram obtidos comercialmente à Merck Darmstad – Alemanha, à Sigma Aldrich – EUA, ou à Panreac Química SA – Espanha. A berberina foi obtida comercialmente à Sigma Aldrich – EUA.

Os produtos e materiais específicos vão ser descritos ao longo da metodologia.

2.2 Métodos

2.2.1 Animais

Neste estudo foram utilizados dois modelos animais: ratos normais Wistar (W) e ratos Goto-Kakizaki (GK) com diabetes tipo 2 não obesa desenvolvida espontaneamente com a idade, obtidos de colónias da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Ambas as colónias foram mantidas a uma temperatura e humidade constante (22-24°C e 50-60%, respetivamente), ventilação adequada (12 renovações completas de ar por hora) e ciclos alternados de luz e obscuridade, cada um de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso a ração (dieta standard laboratorial A04-Panlab, Barcelona, Espanha) e a água, sendo esta utilizada como veículo para a administração do produto estudado, berberina.

2.2.2 Tratamento

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais de 12 animais cada: 2 grupos W, um controlo e outro sujeito a tratamento e 2 grupos GK, um controlo e outro sujeito a tratamento. O tratamento consistiu na administração de uma dose de 100mg/kg/dia de berberina dissolvida na água do biberão a partir dos 9 meses, durante 3 meses.

2.2.3 Peso Corporal

O peso corporal (gramas) dos animais em estudo foi determinado no final do tratamento com berberina, pouco antes de estes serem sacrificados.

2.2.4 Determinação da glicemia e da Hemoglobina-A1c

As concentrações de glicemia em jejum (mg/dL) foram determinadas no final do tratamento na veia da cauda dos ratos, através do método da glicose-oxidase recorrendo a utilização de um glicómetro e tiras-teste (Glucometer Elite – Bayer SA, Lisboa, Portugal). Após a determinação da glicemia em jejum, administrou-se intraperitonealmente 6 ml/kg de glicose a 30% (Braun, Queluz de Baixo, Portugal) e determinou-se a glicemia após 2 horas, pelo mesmo processo.

Os níveis de hemoglobina-A1c foram determinados através do sangue total da veia da cauda, usando um analisador automático (DCA 2000 Analyser, Bayer, Health Care Diagnostics Division, Lisboa, Portugal).

2.2.5 Determinação dos níveis plasmáticos de ácidos gordos livres

Os níveis de ácidos gordos foram determinados no plasma através de um teste enzimático colorimétrico utilizando um Kit comercial (Half-Micro test, Roche Applied Science).

2.2.6 Determinação dos níveis plasmáticos de insulina

Os níveis de insulina foram determinados no plasma dos animais através de um kit de ELISA (Ultrasensitive Rat Insulin ELISA, Mercodia).

2.2.7 Colheitas

2.2.7.1 Colheita de sangue

As colheitas de sangue foram realizadas por punção cardíaca após os animais serem submetidos a um jejum de 16-18 horas e anestesiados, por via intramuscular, com cloridrato de quetamina (Parke-Davis, EUA) e cloridrato de clorpromazina (Laboratórios Vitória, Portugal) nas doses de 75 mg/kg e 3 mg/kg respetivamente. A recolha das amostras sanguíneas foi feita em tubos específicos: recolha de plasma (BDVacutainer com 4,5 mg de EDTA) e soro (BDVacutainer sem EDTA). As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 4°C e 35000xg e armazenados a -80°C para posterior análise.

2.2.7.2 Colheita de urina

Os animais foram mantidos em caixas metabólicas, durante 24 horas, e as amostras de urina foram recolhidas e centrifugadas (10 minutos, 25000xg, 4°C) e armazenadas a -80°C para posterior análise.

2.2.7.3 Colheita de órgãos

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o músculo-esquelético e o fígado foram recolhidos e colocados em azoto líquido e armazenados a -80°C para posterior análise.

2.2.8 Homogeneização do fígado

Utilizou-se uma fatia de fígado congelado, cerca de 200 mg, que foi homogeneizado em 2 ml de tampão de lise (tabela I) e seguidamente sonicada. Procedeu-se a duas centrifugações (20 minutos, 14000xg, 4°C) recolhendo-se, sucessivamente o sobrenadante. No fim e após determinação da concentração de proteína na amostra pelo método do BCA (BCA protein, Pierce, USA) adicionou-se tampão *Sample* às amostras que foram posteriormente armazenadas a -80°C.

2.2.9 Homogeneização do músculo-esquelético

Utilizou-se uma fatia de músculo-esquelético congelado, cerca de 200 mg, que foi homogeneizado em 2 ml de tampão de lise (tabela I). Após 30 minutos em gelo estas foram sonicadas ficando mais 30 minutos em gelo.

De seguida, procedeu-se a duas centrifugações (20 minutos, 14000xg, 4°C) recolhendo-se o sobrenadante no fim de cada centrifugação. No fim e após determinação da concentração de proteína na amostra pelo método do BCA (BCA protein, Pierce, USA) adicionou-se tampão *Sample* às amostras que foram armazenadas a -80°C.

2.2.10 Western blot

A identificação e quantificação das proteínas AKT, IRS-1, AMPK e troponina, tanto na sua forma fosforilada como total, foram efetuadas recorrendo a técnica de *western blot*. A tubulina, no caso do IRS-1 no músculo-esquelético, e a actina serviram como controlo da quantidade das amostras. A quantificação das bandas foi calculada através do programa ImageQuant, Molecular Dynamics, EUA.

- Polimerização dos géis

Foram polimerizados géis de 6% e 10% de acrilamida no sistema de polimerização (Mini-PROTEAN 3 CELL, Bio-Rad, EUA) com os tampões *Resolving* e *Stacking* (tabela I).

- Preparação das amostras

As amostras contendo o tampão *Sample* foram descongeladas e fervidas durante 5 minutos sendo posteriormente colocado um volume contendo 40 µg de proteína nos géis exceto no caso do IRS-1 do músculo-esquelético em que se utilizou 80 µg.

- Separação das proteínas no gel

Os géis foram colocados no sistema Mini-PROTEAN 3 CELL (Bio-Rad, EUA) com tampão *Running* (tabela I) e procedeu-se à disposição do padrão (Precision Plus Protein Standards, Dual Color, Bio-Rad, EUA) e das amostras. A corrida efetuou-se a uma voltagem inicial de 80v até a frente de corrida ultrapassar o *Stacking*, sendo

posteriormente aumentada para uma voltagem constante de 140v durante aproximadamente 1 hora.

-Transferência

No fim da corrida, as proteínas separadas por peso no gel foram transferidas para membranas de PVDF (Polyvinylidene fluoride membrane, Bio-Rad, EUA), previamente ativadas com metanol e hidratadas com água ultra pura. A transferência efetuou-se no sistema de transferência (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, EUA), a uma amperagem constante de aproximadamente 300 mA, em tampão CAPS (tabela I).

- Bloqueio

Terminada a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de TBST-BSA 5% (tabela I) ou TBST-Leite 10% (tabela I), caso a proteína a quantificar estivesse na forma fosforilada ou total, respetivamente, à temperatura ambiente, durante 2 horas.

- Incubação com anticorpos

Após o bloqueio as membranas foram deixadas a incubar, durante a noite, a 4°C e com agitação constante, com os respetivos anticorpos primários (anti-AMPK total e fosforilada, Cell Signalling, EUA; anti-AKT total e fosforilada, Cell Signalling, EUA; anti-IRS-1 total e fosforilada, Cell Signalling, EUA, anti-Troponin total e fosforilada Cell Signaling, EUA; Mouse monoclonal anti-actin antibody, Chemicon International Serologicals Company, EUA; Rabbit polyclonal Tubulin antibody, Abcam, Reino Unido). No dia seguinte efetuaram-se 3 lavagens de 20 minutos com a solução de lavagem TBST e incubou-se as membranas com o respetivo anticorpo secundário (Goat Anti-rabbit HRP Conjugate, Biorad; Anti-mouse antibody, Secondary Anti-Mouse, GE Healthcare, Reino Unido) durante 1 hora a temperatura ambiente e com agitação constante. As membranas foram novamente lavadas com o tampão de lavagem para retirar o excesso de anticorpo secundário.

- Revelação

No fim da lavagem as membranas foram incubadas com o devido substrato enzimático ECF (Mouse ECF Western Blotting Reagent Pack, Amersham Biosciences,

Reino Unido), durante aproximadamente 2 minutos e reveladas através do leitor de fluorescência (Typhoon, GE Healthcare, USA).

Tabela I- Soluções utilizadas em *Western blot*

Tampão de lise
25 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 20 mM NaF; 2mM Na ₃ VO ₄ ; 10 mM β-glicerofosfato; 2,5mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 20 µl cocktail inibidor de proteases por 0,5 g de tecido
Tampão <i>Sample</i> (6x)
62,5mM Tris-HCl, pH 6,6; 20% SDS 10%; 2,5 mL glicerol; 0,05% Bromefenol Blue
Tampão <i>Resolving</i>
0,75mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 8,8
Tampão <i>Stacking</i>
0,25mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 6,8
Tampão <i>Running</i>
125mM Tris-Base; 480mM Glicina; 9mM SDS; pH 8,8
Tampão CAPS
50mM CAPS; 2% NaOH; pH 11;10% metanol
Tampão TBS
250mM Tris; 1,5mM NaCl; pH 7,6
Tampão TBST
Solução TBS; 1% Tween-20

2.2.11 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como valor médio +/- erro padrão da média (epm). Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA, sendo os valores de $p < 0,05$ considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 Caracterização geral

3.1.1 Peso corporal

No final dos 3 meses de tratamento, verificou-se que os ratos W tratados com berberina (W+B) apresentavam um peso corporal inferior aos respetivos controlos (W). Os grupos de animais GK, por sua vez, apresentavam um peso corporal inferior aos animais W. O tratamento com berberina não modificou o peso corporal dos ratos GK (tabela II).

Tabela II – Peso Corporal

O peso corporal dos ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B) foi medido em jejum.

	W	W+B	GK	GK+B
Peso corporal (g)	531,9±16,1	470,6±15 **	400,1±5,5 ***	388,5±7 ***

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=12

** p<0,01; ***p<0,01 vs ratos W

3.1.2 Perfil glicémico e HbA1c

A glicemia, em jejum e 2 horas após administração de glicose intraperitoneal assim como os níveis de hemoglobina glicosilada foram significativamente superiores nos ratos GK quando comparados com os ratos W, demonstrando uma intolerância à glicose pronunciada. A administração de berberina nos ratos W, (W+B), não promoveu diferenças significativas em relação ao controlo (W), no entanto verificou-se uma diminuição destes três parâmetros nos ratos GK que foram submetidos a tratamento com berberina (tabela III).

Tabela III – Glicemia, em jejum e 2 horas após administração de glicose e HbA1c

Glicemia em jejum e 2 horas após administração intraperitoneal de glicose e a hemoglobina glicosilada dos ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B) no fim do tratamento de 3 meses com berberina.

	W	W+B	GK	GK+B
Glicose em jejum (mg/dL)	70,2±1,2	68,9±1,5	98,38±3,2 ***	78±2,6 ###
Glicose 2h (mg/dL)	90±3,2	89,5±2,6	335,4±25,9 ***	261±7,6 ###
HbA1c (%)	3,32±0,055	3,58±0,037	6,5±0,18 ***	5,64±0,2 ##

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=12.
*** p<0,001 vs ratos W; ### p<0,001 vs ratos GK; ## p<0,01 vs ratos GK.

3.1.3 Perfil lipídico

A nível lipídico apenas foram observadas diferenças no colesterol total e triglicerídeos. Os ratos GK apresentaram um aumento significativo dos valores quando comparados com os ratos W. O tratamento com a berberina não teve efeito no perfil lipídico tanto nos ratos W como GK (tabela IV).

Tabela IV – Níveis de colesterol total, triglicerídeos e colesterol não HDL

Perfil lipídico dos ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B) no fim do tratamento de 3 meses com berberina.

	W	W+B	GK	GK+B
Colesterol total (mg/dL)	113±4,7	109,4±6,4	149,4±7,7 *	132,9±11,3
Triglicerídeos (mg/dL)	89±7,4	77,9±6,6	127±11,2 *	122,2±11,7
Colesterol não HDL (mg/dL)	51±2,4	51,8±3,6	53,95±4,7	50,37±5

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=12.
* p<0,05 vs ratos W.

3.1.4 Níveis plasmáticos de ácidos gordos livres

Apesar de haver um ligeiro aumento dos níveis de ácidos gordos livres nos animais GK quando comparados com W, esta diferença não foi significativa. Os animais tratados com berberina não apresentaram diferenças quando comparados com os respetivos controlos (figura 14).

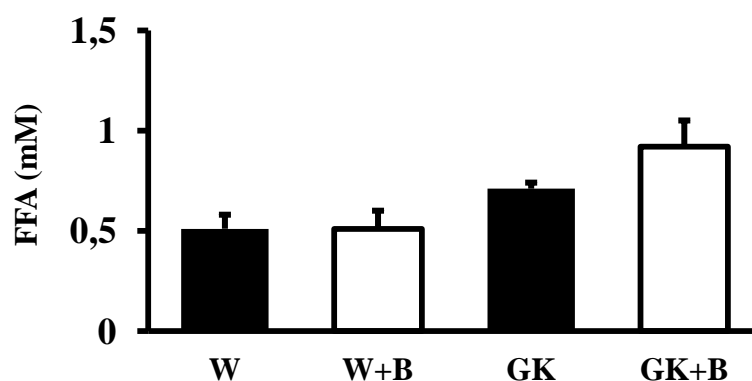


Figura 14: Níveis plasmáticos de ácidos gordos (mM) em ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B) durante 3 meses. Os resultados são apresentados como média \pm epm, n=10.

3.1.5 Níveis plasmáticos de insulina

Os animais GK apresentaram níveis de insulina inferiores aos animais W, no entanto, não existem diferenças entre os animais diabéticos tratados com berberina (GK+B) e o respetivo controlo (GK). O tratamento com berberina não promoveu diferenças significativas nos animais W (figura 15).

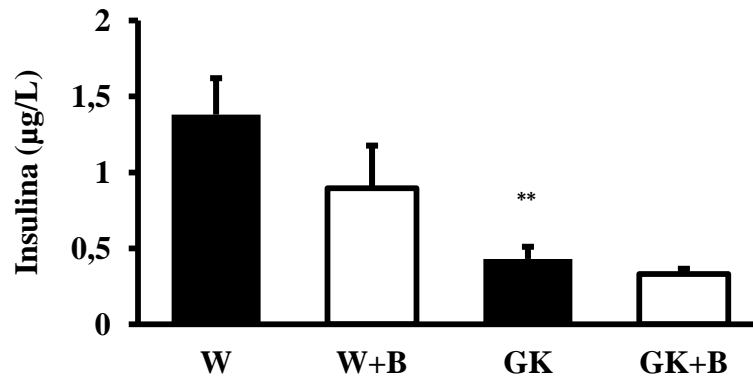


Figura 15: Níveis plasmáticos de insulina ($\mu\text{g/L}$) em ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B) durante 3 meses. Os resultados são apresentados como média \pm epm, $n=10$.
** $p<0,01$ vs ratos W

3.2 Caracterização da resposta hepática ao tratamento com berberina

Para compreender o efeito terapêutico da berberina no fígado decidimos estudar algumas proteínas chave das principais vias envolvidas na utilização periférica de glicose: a via da insulina e a via da AMPK. Assim, foram avaliadas as proteínas AMPK, IRS-1 e AKT através de *western blot*.

3.2.1 AMPK total e fosforilada

A AMPK pode ser ativada por uma alteração no balanço energético e a sua via tem sido descrita como um dos mecanismos pela qual a berberina atua, por isso decidimos verificar se o tratamento teria algum efeito nesta proteína. No entanto, não obtivemos nenhuma diferença entre os grupos avaliados (figura 16).

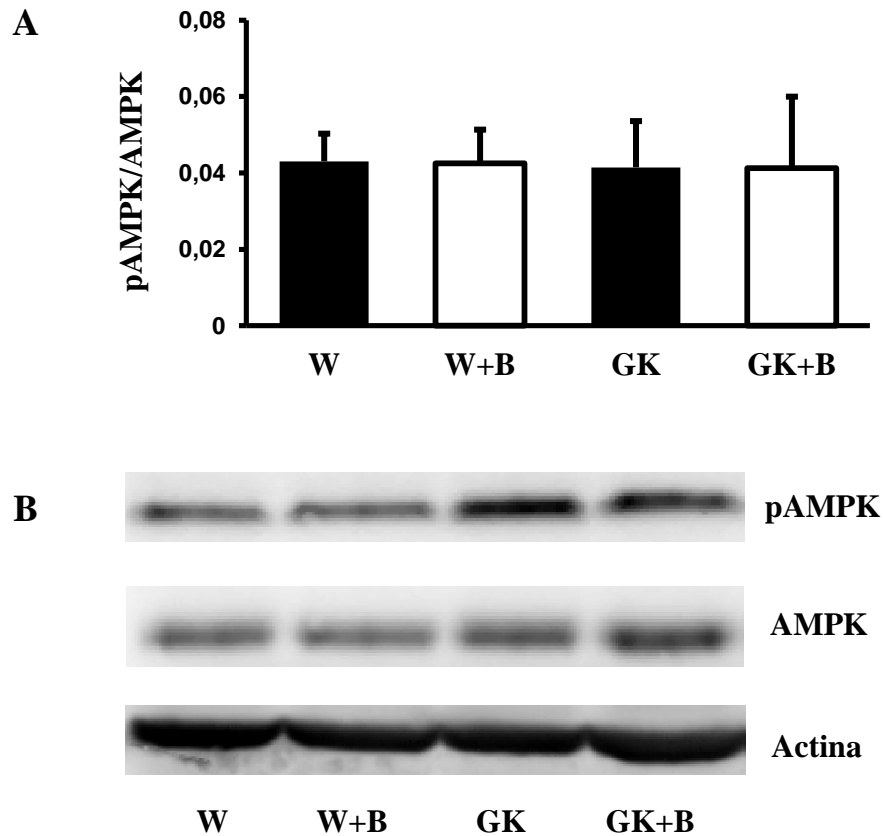


Figura 16: Determinação do conteúdo proteico de AMPK (total e fosforilada) no fígado de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). **A.** Densitometria média do rácio pAMPK/AMPK após normalização para a actina. **B.** *Western blot* representativo do conteúdo proteico de AMPK (total e fosforilada) e de actina. Valores médios \pm epm (n=8).

3.2.2 IRS-1 total e fosforilada

O substrato do recetor da insulina (IRS-1) é ativado após ligação da insulina ao respetivo recetor, o que desencadeia uma cascada de sinalização que leva à captação de glicose, por isso mesmo foi escolhido para o estudo da via da insulina. Tal como na AMPK não houve diferenças significativas entre o rácio das frações fosforiladas e totais nos grupos estudados (figura 17).

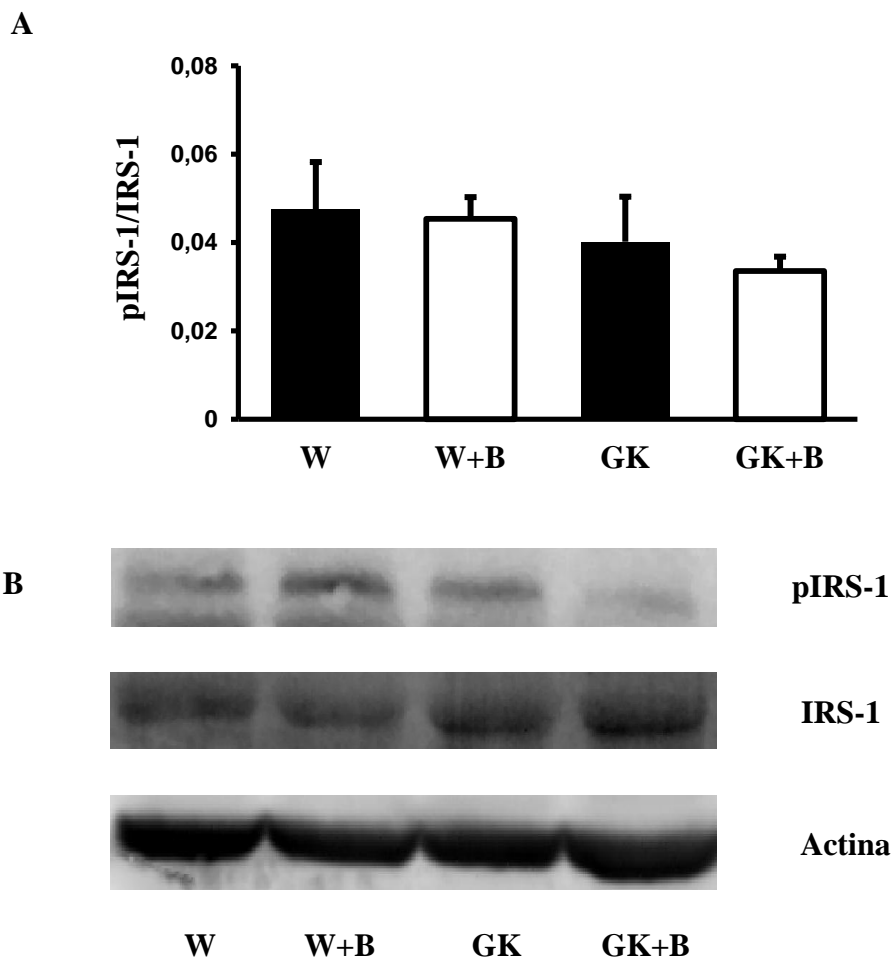


Figura 17: Determinação do conteúdo proteico de IRS-1 (total e fosforilado) no fígado de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). **A.** Densitometria média do rácio pIRS-1/IRS-1 após normalização para a actina. **B.** *Western blot* representativo do conteúdo proteico de IRS-1 (total e fosforilado) e de actina. Valores médios \pm epm (n=8).

3.2.3 AKT total e fosforilada

A AKT é uma das proteínas envolvidas na cascada de sinalização iniciada pelo IRS-1 essencial para a translocação do transportador de glicose, GLUT4; sendo por isso um componente importante na via da insulina. O aumento desta proteína permite-nos inferir se a via da insulina está a ser ativada e, se existe ou não, alguma interrupção que impeça a translocação dos transportadores e consequentemente a captação de glicose. A partir dos dados recolhidos observou-se que o conteúdo proteico da AKT não foi alterado com o tratamento, e que os ratos normais W não apresentaram diferenças relativamente aos ratos GK diabéticos (figura 18).

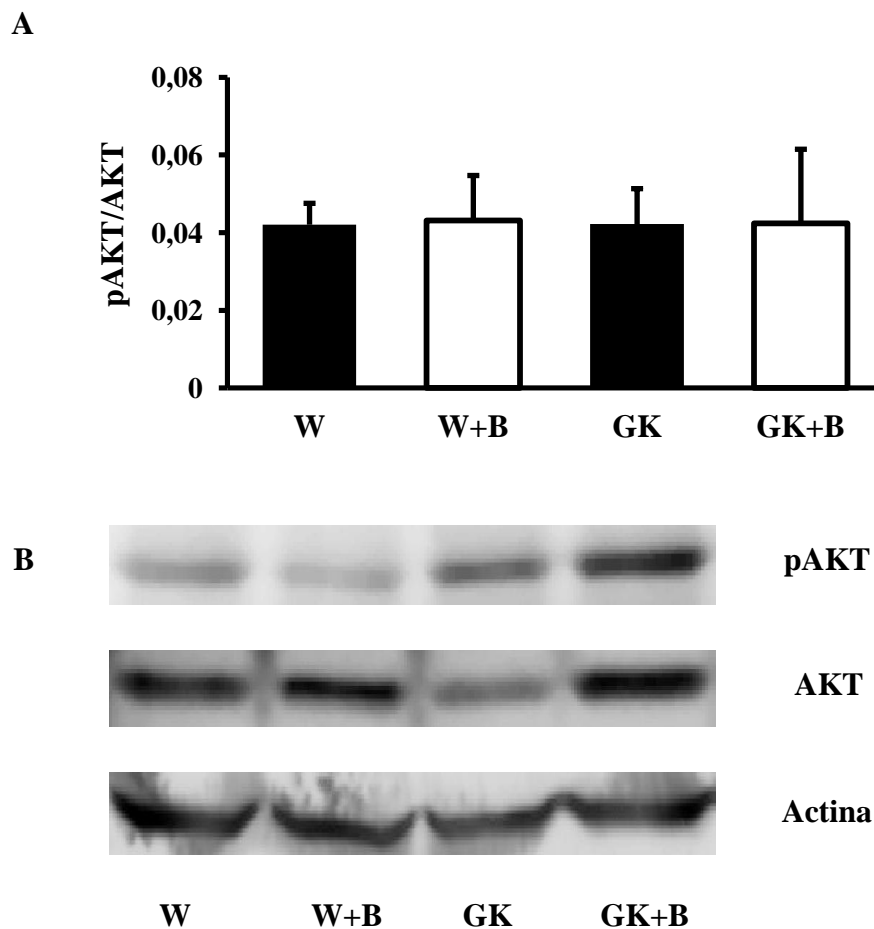


Figura 18: Determinação do conteúdo proteico de AKT (total e fosforilada) no fígado de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). **A.** Densitometria média do rácio pAKT/AKT após normalização para a actina. **B.** *Western blot* representativo do conteúdo proteico de AKT (total e fosforilada) e de actina. Valores médios \pm epm (n=8).

3.3. Caracterização da resposta no músculo-esquelético ao tratamento com berberina

O músculo-esquelético é um órgão importante no metabolismo da glicose porque é o principal local de utilização periférica de glicose em condições pós-prandiais (dependente de insulina). É também importante no armazenamento energético. A diminuição da sensibilidade à insulina neste órgão periférico é de enorme importância na diabetes tipo 2. Como tal foram estudadas as mesmas proteínas que no fígado para verificar se a berberina tinha ou não um efeito terapêutico na resistência à insulina neste órgão.

3.3.1 AMPK total e fosforilada

No músculo-esquelético não ocorreram diferenças significativas no conteúdo proteico entre a fração fosforilada da AMPK e a fração total, ou seja, esta via não foi ativada com a berberina. Tal como no fígado a berberina não foi eficaz a este nível (figura 19).

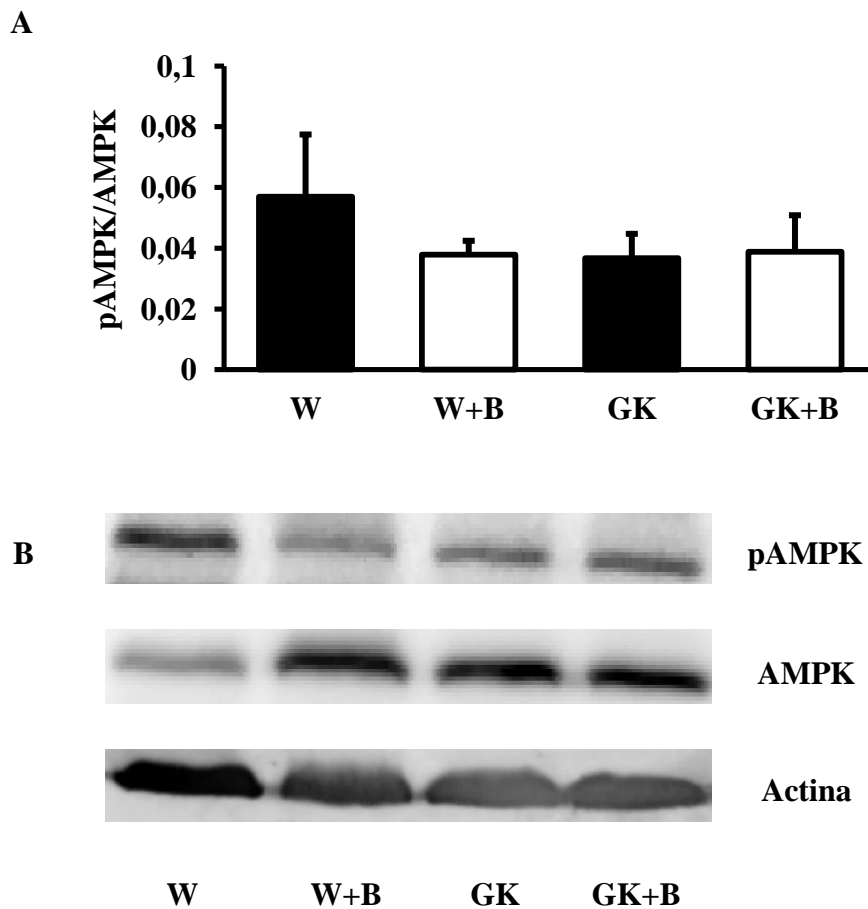
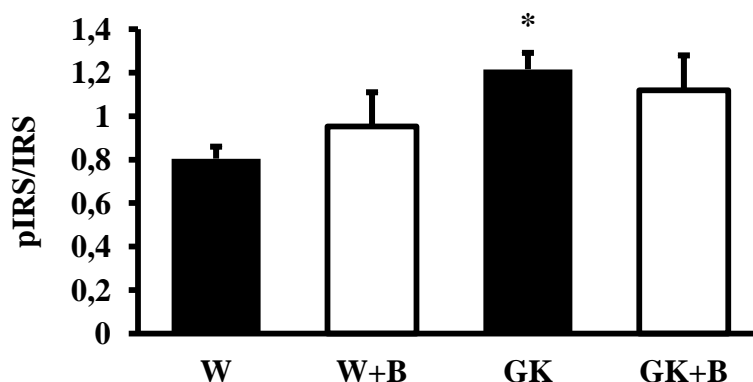


Figura 19: Determinação do conteúdo proteico de AMPK (total e fosforilada) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). **A.** Densitometria média do rácio pAMPK/AMPK após normalização para a actina. **B.** *Western blot* representativo do conteúdo proteico de AMPK (total e fosforilada) e de actina. Valores médios \pm epm (n=6).

3.3.2 IRS-1 total e fosforilada

Em relação ao IRS-1, os ratos W tratados com berberina apresentaram uma tendência para a razão pIRS-1/IRS ser maior que nos controles W mas esta diferença não foi estatisticamente significativa. No entanto o mesmo não se passa quando comparamos os ratos W com os ratos GK. A razão pIRS-1/IRS-1 total foi significativamente mais elevada no grupo de ratos diabéticos GK. Os restantes grupos não apresentaram diferenças significativas (figura 20). Mais uma vez a berberina não promoveu nenhuma alteração nesta via de sinalização.

A



B

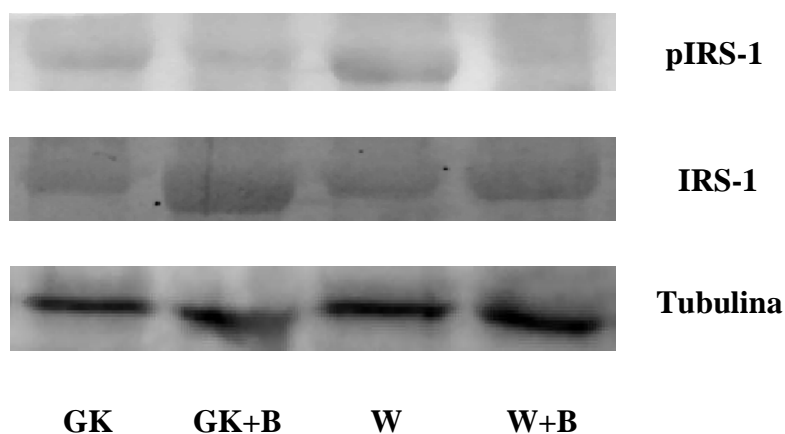
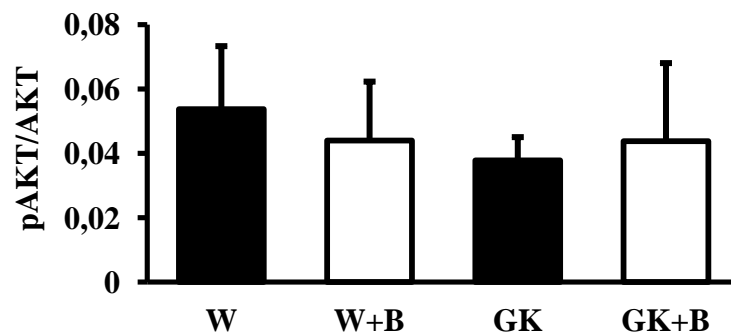


Figura 20: Determinação do conteúdo proteico de IRS-1 (total e fosforilado) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). **A.** Densitometria média do rácio pIRS-1/IRS-1 após normalização para a actina. **B.** *Western blot* representativo do conteúdo proteico de IRS-1 (total e fosforilado) e de actina. Valores médios \pm epm (n=4).

3.3.3 AKT total e fosforilada

A razão pAKT/AKT total não apresentou diferenças entre os grupos estudados (figura 21).

A



B

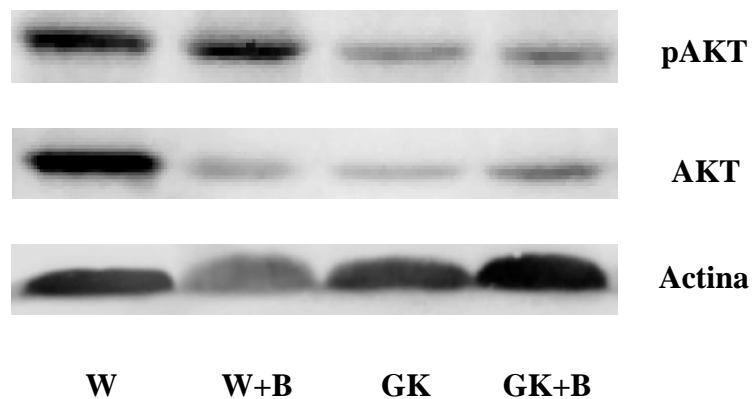


Figura21: Determinação do conteúdo proteico de AKT (total e fosforilada) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). **A.** Densitometria média do rácio pAKT/AKT após normalização para a actina. **B.** *Western blot* representativo do conteúdo proteico de AKT (total e fosforilada) e de actina. Valores médios \pm epm (n=6).

3.3.4 Troponina total e fosforilada

A troponina é uma proteína reguladora no processo de contração muscular. A sua monitorização permite demonstrar que o efeito na AMPK se deveu exclusivamente ao tratamento e não a uma variação do balanço energético provocado pela contração. O conteúdo proteico da razão pTroponina/troponina total não variou entre os ratos GK e os ratos W. O tratamento com berberina não demonstrou ter efeito nesta proteína nos animais estudados (figura 22).

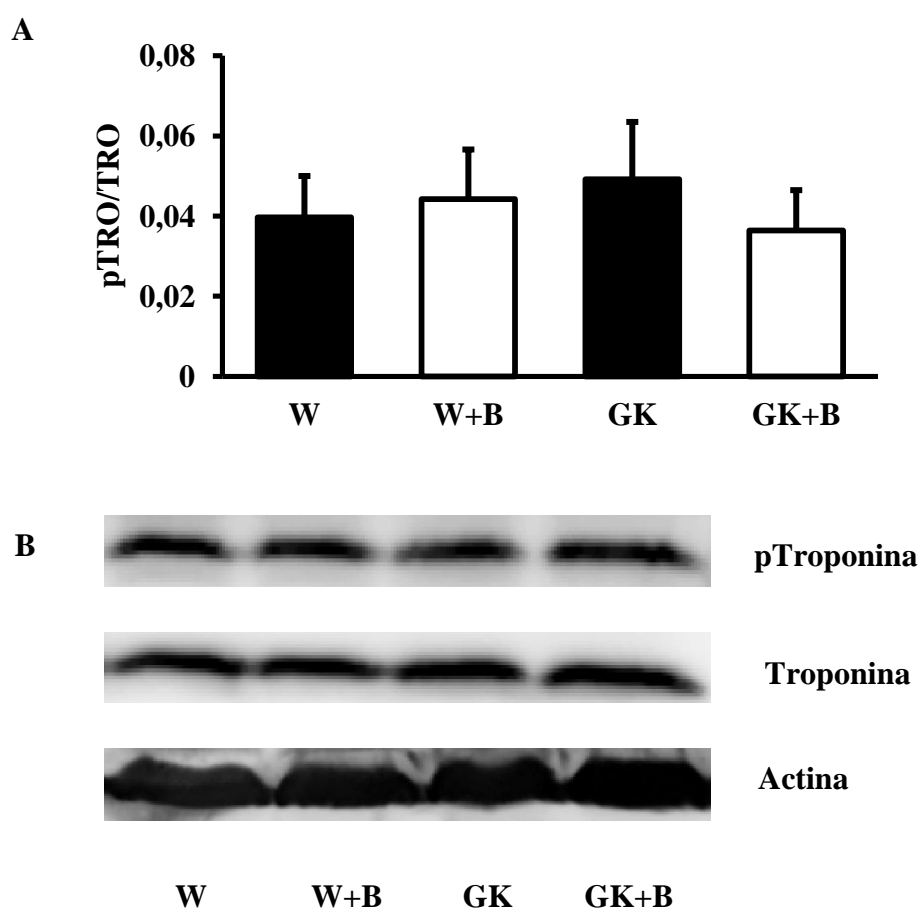


Figura 22: Determinação do conteúdo proteico de troponina (total e fosforilada) no músculo-esquelético de ratos W, W tratados com berberina (W+B), GK e GK tratados com berberina (GK+B). **A.** Densitometria média do rácio pTRO/TRO após normalização para a actina. **B.** *Western blot* representativo do conteúdo proteico de troponina (total e fosforilada) e de actina. Valores médios \pm epm (n=6).

4. Discussão

A diabetes *mellitus* tipo 2 é uma patologia cada vez mais comum na população devido às alterações no estilo de vida dos últimos anos. Sendo a principal causa de morbidade e morte devido às complicações associadas é fundamental desenvolver terapias alternativas para atenuar os efeitos deste distúrbio.

A berberina tem sido considerada um bom candidato para o tratamento de diabetes tipo 2 devido ao seu efeito hipoglicémico. Pensa-se que a via da AMPK poderá ser a principal responsável por estes efeitos. Neste trabalho, estudámos o efeito terapêutico desta molécula a nível da sensibilidade à insulina em ratos normais Wistar e ratos diabéticos GK não obesos. Para isso analisámos não só diversos parâmetros metabólicos como as duas principais vias de sinalização que levam a captação de glicose: a via de sinalização da insulina e a via de sinalização da AMPK através da quantificação de proteínas chave de cada uma das vias por *western blot*.

Verificámos que o tratamento com berberina diminuiu significativamente o peso corporal nos ratos Wistar. Alguns estudos descrevem que a berberina não tem qualquer efeito no peso corporal (Zhang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011), enquanto outros observam uma diminuição deste parâmetro (Lee *et al.*, 2006).

Os ratos GK, como esperado, mostraram uma marcada intolerância à glicose com níveis de glicemia em jejum e 2 horas após a administração de glicose intraperitonealmente elevados (Seiça *et al.*, 2004). Tal como observado por Zhang e colegas (2011), os nossos resultados mostraram que a berberina tem uma ação no metabolismo da glicose melhorando a glicemia em jejum, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (Zhang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Nos ratos normais o tratamento com berberina não teve nenhum efeito. Sendo estes animais normoglicémicos é positivo que a berberina não promova hipoglicémias.

Apesar da berberina ter apresentado efeitos benéficos na diminuição da glicemia nos ratos GK, não promoveu nenhuma alteração nos níveis de insulina plasmática destes animais, ou seja, não provocou nenhuma alteração na secreção de insulina e/ou funcionamento da célula β pancreática. A diabetes de longa duração presente nos ratos diabéticos GK, eventualmente conduz à falência da célula β , que deixa de produzir, o que explica os níveis baixos de insulina do animal diabético relativamente aos ratos W controle. Por outro lado, os ratos W mantêm a sua normoglicemia graças ao aumento da secreção de insulina em resposta ao aumento de peso corporal e à adiposidade visceral

que ocorre neste modelo animal. A falência da célula β observada no rato diabético com um ano de idade conduz a uma diminuição da libertação de insulina e exacerba a sua hiperglicemia neste modelo de diabetes tipo 2.

Neste trabalho também medimos a hemoglobina glicosilada porque é um fator preponderante para a monitorização da glicemia e avaliação dos riscos de complicações em pacientes diabéticos (Manley, 2003; Zhang *et al.*, 2010), e verificámos que a berberina realmente tem um efeito benéfico no tratamento de diabetes comprovado pela diminuição dos valores da hemoglobina glicosilada nos ratos diabéticos GK encontrando-se de acordo com outro estudo realizado por Zhang e colegas em 2010.

O aumento de ácidos gordos livres e triglicerídeos afeta não só o sistema cardiovascular mas também a secreção de insulina e o seu modo de atuação (Chen *et al.*, 2011). Níveis elevados de triglicerídeos no sangue estão associados a níveis elevados de ácidos gordos em circulação (Tripathy *et al.*, 2003) o que afeta a sensibilidade periférica à insulina (Kashyap *et al.*, 2009). Um aumento progressivo de ácidos gordos no plasma causa uma inibição da estimulação da captação de glicose e utilização em humanos (Belfort *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2011). Por isso mesmo quantificámos os níveis de triglicerídeos, colesterol total, colesterol não HDL e ácidos gordos livres plasmáticos e verificámos que a berberina não alterou estes parâmetros, nem nos ratos normais nem nos ratos GK. No entanto, todos os parâmetros, exceto o colesterol não HDL, estavam mais elevados nos ratos GK que nos ratos Wistar demonstrando que o aumento de ácidos gordos e triglicerídeos no plasma estão relacionados com a diminuição da sensibilidade à insulina e disfunção da célula β pancreática, neste modelo com marcada intolerância à glicose (Chen *et al.*, 2011; Huffman *et al.*, 2009).

Os ratos GK apresentaram um perfil lipídico e glicémico concordante com outros trabalhos realizados anteriormente (Sena *et al.*, 2009).

Como a berberina mostrou ter um efeito hipoglicémico nos ratos GK, estudámos as duas principais vias de sinalização que levam à captação de glicose, a via da AMPK ativada normalmente pela contração/exercício e a via da insulina (Krook *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2006).

A literatura tem sugerido a via da AMPK como o mecanismo pela qual a berberina atua (Cheng *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*,

2011). Este processo seria independente da insulina, no entanto neste trabalho não houve nenhuma alteração a este nível após tratamento com berberina. O que não exclui a hipótese de haver outras vias de sinalização onde a berberina atua. A metformina também foi descrita como ativadora da via da AMPK, no entanto, diminuiu de forma idêntica a gliconeogênese e a glicemia em ratos sem a subunidade catalítica da AMPK (Foretz *et al.*, 2010).

O recetor da insulina é essencial para a ligação da mesma nas células alvo (Kong *et al.*, 2009). A ligação da insulina ao recetor desencadeia uma via intracelular que inclui a ativação do recetor, a fosforilação do IRS, bem como uma série de eventos posteriores envolvendo a PI3-cinase e AKT (Gonzalez-Sanchez e Serrano-Rios, 2007; Kong *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

O tratamento com berberina não ativou a via da insulina, pois não ocorreram alterações dos conteúdos proteicos de IRS-1 e de AKT. Estes resultados são concordantes com outros trabalhos em que a fosforilação da AKT foi fraca ou inexistente (Cheng *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010) e a fosforilação da tirosina da IRS-1 não aumentou após tratamento com berberina (Kim *et al.*, 2007). Zhou e colaboradores mostraram que a berberina não ativa a AKT e que, mesmo na presença de *wortmannin* (inibidor seletivo da PI3-cinase), estimula a captação de glicose, sugerindo que a via de sinalização da berberina é independente da via da PI3-cinase (Zhou *et al.*, 2007). Pelo contrário, outros estudos demonstraram uma ativação da AKT e de IRS após tratamento com berberina (Chen *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012).

As investigações feitas até à data não são conclusivas quanto ao mecanismo de ação desta molécula, sendo necessário estudos adicionais para verificar/confirmar os resultados que têm sido descritos, não descurando a possibilidade de que a berberina pode ativar/alterar mais do que uma via. Neste trabalho, nem a via da AMPK nem a via da insulina foram ativadas. Com as doses de berberina biodisponíveis não foi possível visualizar esta ativação. No entanto, não quer dizer que a berberina não possa atuar através de uma delas utilizando concentrações superiores deste alcalóide. Sheng e colegas, descreveram que a berberina tem uma baixa biodisponibilidade quando administrada oralmente, (método de administração utilizado neste estudo) (Sheng *et al.*, 1993). Por outro lado, Zhang e colegas e Ye e colegas demonstraram que, para este método de administração, são necessárias doses muito superiores às usadas no presente

estudo para obter níveis biodisponíveis de berberina capazes de serem efetivos (Ye *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008; Domitrovic *et al.*, 2011).

Os metabolitos da berberina encontrados na urina de ratos após administração oral e intra-peritoneal são os mesmos, sugerindo que são formados após absorção e não no trato gastrointestinal (Qiu *et al.*, 2008). Além disso, parece que esses metabólicos são os componentes ativos da berberina (Tsai e Tsai, 2004; Zuo *et al.* 2006; Domitrovic *et al.*, 2011). Pa e colaboradores demonstraram que a absorção da berberina é comprometida por uma glicoproteína-P, presente nas células epiteliais da parede intestinal. Inicialmente, apenas 5% da berberina ingerida é absorvida, quando estes autores administraram inibidores da glicoproteína-P, a absorção da berberina era seis vezes superiores à inicial (Pa *et al.*, 2002).

A baixa dose utilizada (100 mg/kg/dia), comparando com outros estudos como Zhang e colegas que utilizaram 250 mg/kg/dia, associado ao método de administração e a baixa biodisponibilidade da berberina poderão justificar a ausência de efeitos observados (Zhang *et al.*, 2011). Para além disso, os mecanismos e as vias de sinalização dos animais utilizados podiam estar alterados devido à idade avançada destes, 12 meses, podendo este facto ter influenciado o tratamento com a berberina. Para termos a certeza da influência da idade no estudo deveríamos repeti-lo comparando os dados obtidos com dados de animais mais novos.

O facto de a berberina ser descrita como ativadora da AMPK, e nalguns casos como promotora da via de sinalização da PI3-cinase/AKT, não exclui a possibilidade de existirem mais vias envolvidas no seu processo de ação.

Chen e colaboradores demonstraram que o choque osmótico em adipócitos 3T3L1 estimula o transporte de glicose através do aumento da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática. Este processo envolve tirosinas cinases posteriores a PI3-cinase e AKT (Chen *et al.*, 1997). Outros dois estudos mostraram que a via da p38-MAPK estimula a translocação dos transportadores GLUT4 para a membrana plasmática sem envolver a ativação da via da PI3-cinase/AKT (Konrad *et al.*, 2001; Somwar *et al.*, 2001). Os estudos referidos demonstraram que existem mais vias envolvidas na captação de glicose para além das que foram aqui avaliadas o que pode explicar o facto da berberina, neste projeto, ter tido um efeito hipoglicémico sem ativar as duas principais vias descritas para a captação de glicose. Cheng *et al* demonstraram

que em miotubos L6 a captação de glicose envolvia tanto a AMPK como a p38-MAPK (Cheng *et al.*, 2006), o que pode explicar o facto de termos tido um efeito hipoglicémico mas nenhuma diferença nos outros parâmetros. A dose de berberina administrada foi suficiente para ativar a p38-MAPK mas não para ativar outras vias, promovendo apenas um efeito hipoglicémico.

Outra proteína que analisámos foi a troponina que corresponde a um complexo de três proteínas que participam no processo de contração muscular no músculo-esquelético e cardíaco (Berchtold *et al.*, 2000). No músculo-esquelético, o cálcio é libertado transitoriamente do retículo sarcoplasmático ativando a contração muscular e utilizando a troponina C como alvo. A ligação do cálcio à subunidade C da troponina influencia a sua estrutura e das outras subunidades da troponina, levando a ativação da ATPase da miosina, que culmina na contração muscular (Berchtold *et al.*, 2000). Como já foi referido antes, a AMPK é ativada no músculo-esquelético em resposta à contração, resultando no aumento de glicose (Hayashi *et al.*, 1998; Mu *et al.*, 2001; Carling, 2004). Apesar de não termos registado diferenças a nível da troponina, esta servia para excluir a contração como meio de ativação da AMPK, ou seja, esta proteína funcionou como um controlo, para assegurarmos que o que observámos seria exclusivamente proporcionado pela berberina.

Durante este trabalho verificou-se que os ratos diabéticos GK apresentaram conteúdos proteicos de IRS-1 no músculo-esquelético mais elevados que os controlos, o que não seria de esperar já que este modelo é diabético e insulino-resistente. No entanto, a AKT não apresentou diferenças, levando a especular que existe algo entre estas duas proteínas que provocou uma interferência na cascada de sinalização normal da insulina. Um estudo anterior demonstrou que uma interleucina, IL-4, fosforila a IRS-1 ativando a PI3-cinase sem promover a translocação de GLUT4 nem a captação de glicose (Isakoff, 1995). Este estudo pode ajudar a explicar os nossos resultados, uma vez que, tal como esta interleucina ativa a IRS-1 sem promover a captação de glicose, uma molécula (citocina ou outra) pode estar a provocar o mesmo efeito nestes animais, daí termos maiores níveis desta proteína e não termos visto diferenças na AKT, que promove a translocação de GLUT4 e conseqüentemente a captação de glicose.

5. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito terapêutico da berberina na resistência a insulina nos tecidos periféricos, músculo-esquelético e fígado. Duas vias foram estudadas, a via da insulina que promove a ativação da IRS-1/PI3-cinase/AKT e a via da AMPK. Escolhemos estas duas vias porque estão descritas na literatura como sendo as potenciais vias pelas quais a berberina atua, promovendo o seu efeito benéfico tanto no metabolismo da glicose como dos lípidos.

Foram estudados dois modelos de animais, um rato não obeso diabético tipo 2 (GK) e outro rato normal (Wistar). Verificámos que os ratos GK possuíam uma acentuada intolerância a glicose e que os níveis de lípidos eram superiores quando comparados com os ratos controlo, o que demonstra a relação entre a resistência à insulina e o aumento dos níveis de lípidos circulantes.

A nível sistémico a berberina não provocou nenhuma alteração no metabolismo da glicose e dos lípidos nos animais Wistar, mas mostrou ter um efeito hipoglicémico nos ratos diabéticos GK.

Tanto no músculo-esquelético como no fígado, a berberina não alterou a sinalização da AMPK, ou seja, não é através desta que a berberina promove o efeito hipoglicémico que verificámos. No entanto, também não houve alterações nos níveis de IRS-1 e de AKT, proteínas envolvidas na sinalização estimulada pela insulina, o que sugere que a berberina pode atuar por outras vias de sinalização.

A dose de berberina utilizada foi insuficiente para promover a ativação das vias clássicas ativadas pela mesma. Para além disso, os animais utilizados já tinham uma idade avançada, 12 meses, e os seus processos metabólicos estarão mais disfuncionais, podendo ser necessário um aumento da dose em comparação com animais mais novos.

O efeito hipoglicémico observado pode dever-se à ativação de uma outra via de sinalização como a via da p38-MAPK, que chegou a ser descrita como uma candidata no mecanismo de atuação da berberina.

Contudo, apesar de podermos afirmar que a berberina é um composto natural com um efeito hipoglicémico, são necessários mais estudos para compreender qual o mecanismo pelo qual atua e se realmente ela é benéfica na resistência à insulina a nível periférico.

6. Bibliografia

-
- Alessi D.R. e Downes C.P. (1998) The role of PI3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta.* 1436:151-164.
- Belfort R., Mandarino L., Kashyap S., *et al.* (2005) Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes.* 54(6):1640-1648.
- Bergman R.N., Kim S.P., Hsu I.R., *et al.* (2007) Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *AmJ Med.* 120:S3-S8.
- Berchtold M.W., Brinkmeier H. e Muntener M.M. (2000) Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *American Physiological Society.* 80(3):1215-1265.
- Boden G., Chen X., Ruiz J., *et al.* (1994) Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest.* 93:2438-2446.
- Boden G. e Shulman G.I. (2002) Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest.* 33(3):14-23.
- Brown G.K. (2000) Glucose transporters: Structure, function and consequences of deficiency. *J.Inherit. Metab.* 23:237-246.
- Carling D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade - a unifying system for energy control. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 29(1):18-24.
- Chen Q.M. e Xie M.Z. (1986) Studies on the hypoglycemic effect of *Coptis chinensis* and berberine. *Yao Xue Xue Bao.* 21:401-406.
- Chen D., Elmendorf J.S., Olson A.L., *et al.* (1997) Osmotic Shock Stimulates GLUT4 Translocation in 3T3L1 Adipocytes by a Novel Tyrosine Kinase Pathway. *The Journal of Biological Chemistry.* 272(43):27401-27410
- Chen C., Zhang Y. e Huang C. (2010) Berberine inhibits PTP1B activity and mimics insulin action. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 397:543-547.
- Chen Y., Wang Y., Zhang J., *et al.* (2011) Berberine Improves Glucose Homeostasis in Streptozocin-Induced Diabetic Rats in Association with Multiple Factors of Insulin Resistance. *ISRN Endocrinology.* 2011:1-8.
- Cheng Z., Pang T., Gu M., *et al.* (2006) Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1760:1682-1689.

-
- Coffer P.J., Jin J. e Woodgett J.R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* 335:1-13.
- Cohen P., Alessi D.R. e Cross D.A (1997) PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *Growth Regul.* 410:3-10.
- Cornier M-A., Dabelea D., Hernandez T.L., *et al.* (2008) The Metabolic Syndrome *Endocrine Reviews.* 29(7):777-822.
- Cushman S.W. e Wardzala L.J. (1980) Potencial mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 255:4758-4762.
- DeFronzo R.A. e Tripathy D. (2009) Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 32(2):S157-S163.
- Dresner A., Laurent D., Marcucci M., *et al.* (1999) Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103:253-259.
- Domitrovic R., Jakovac H. e Blagojevic G. (2011) Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- α , COX-2, and iNOS expression in CCL₄ intoxicated mice. *Toxicology.* 280:33-43.
- Eckel R.H. (1989) Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.* 320:1060-1068.
- Egawa K., Nakashima N., Sharma P.M., *et al.* (2000) Persistent activation of phosphatidylinositol 3-kinase causes insulin resistance due to accelerated insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology.* 141:1930-1935.
- Foretz M., Hebrard S., Leclerc J., *et al.* (2010) Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* 120(7):2355-2369.
- Foti D., Chiefari E., Fedele M., *et al.* (2005) Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat Med.* 11:765-773.
- Fryer L.G.D., Fougelle F., Barnes K., *et al.* (2002) Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J.* 363(1):167-174.

-
- Ginsberg H.N. (2000) Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 106:453-458.
- Ginsberg H.N., Zhang Y.L., Hernandez-Ono A. (2005) Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res.* 36:232-240.
- Gao C.R., Zhang J.Q. e Huang Q.L. (1997) Experimental study on berberine raised insulin sensitivity in insulin resistance rat models. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 17:162-164.
- Gonzalez-Baro M.R., Lewin T.M. e Coleman R.A. (2007) Regulation of triglyceride metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292:G1195-G1199.
- Gonzalez-Sanchez J.L. e Serrano-Rios M. (2007) Molecular basis of insulin action. *Drug News Perspect.* 20:527-531.
- Goodyear L.J., Chang P.Y., Sherwood S.D., *et al.* (1996) Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 271:E403-E408.
- Gual P., Marchand-Brustel Y.L. e Tanti J-F. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 87:99-109.
- Hall R.K., Yamasaki T., Kucera T., *et al.* (2000) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *J Biol Chem.* 275:30169-30175.
- Hardie D.G. (2003) Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology.* 144:5179-5183.
- Hayashi, T., Hirshman M.F., Kurth E.J. (1998) Evidence for AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes.* 47:1369-1373.
- Huffman K.M., Shah S.H., Stevens R.D., *et al.* (2009) Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care.* 32(9):1678-1683.
- Imanshahidi M. e Hosseinzadeh H. (2008) Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine. *Phytother.* 22:999-1012.

-
- Isakoff S.J., Taha C., Rose E., *et al.* (1995) The inability of phosphatidylinositol 3 kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:10247-10251.
- Itani S.I., Ruderman N.B., Schmieder F., *et al.* (2002) Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I kappa B alpha. *Diabetes.*51:2005-2011.
- James D.E., Strube M., Mueckler M. (1989) Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transport. *Nature.* 338:83-87.
- Jensen M.D., Caruso M., Heiling V., *et al.* (1989) Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes.* 38:1595-1601.
- Kasuga M., Fujita-Yamaguchi Y., Blithe D.L., e Kahn C.R. (1983) Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:2137-2141.
- Kashyap S.R., Ioachimescu A.G., Gornik H.I., *et al.* (2009). Lipid-induced insulin resistance is associated with increased monocyte expression of scavenger receptor CD36 and internalization of oxidized LDL. *Obesity.* 17(12):2142-2148.
- Kiberstis P.A. (2005) A surfeit of suspects. *Science.* 307(5708):369.
- Kim J.K., Fillmore J.J., Chen Y., *et al.* (2001) Tissue specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:7522-7527.
- Kim S.H., Shin E-J., Kim E-D., *et al.* (2007) Berberine activates GLUT1- mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 30(11):2120-2125.
- Kim W.S., Lee Y.S., Cha S.H., *et al.* (2009) Berberine improves lipid dysregulation in obesity by controlling central and peripheral AMPK activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296:812-819.
- Kong W., Wei J., Abidi P., *et al.* (2004) Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins. *Nat Med.* 10:1344-1351.
- Kong W-J., Zhang H., Song D-Q., *et al.* (2009) Berberine reduces insulin resistance through protein Kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression. *Metabolism Clinical and Experiment.* 58:109-119.

-
- Konrad D., Somwar R., Sweeney G., *et al.* (2001) The Antihyperglycemic Drug α Lipoic Acid Stimulates Glucose Uptake via Both GLUT4 Translocation and GLUT4 Activation. Potential Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in GLUT4 Activation. *Diabetes*. 50:1464-1471.
- Kovacic S., Soltys C.L., Barr A.J. *et al.* (2003) Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMPK in the heart. *J. Biol. Chem.* 278:39422–39427.
- Krook A., Wallberg-Henriksson H. e Zierath J.R. (2004) Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36:1212-1217.
- Kupriyanova T.A. e Kandror K.V. (1999) AKT-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J Biol Chem.* 274:1458-1464.
- Lee Y., Kim W.S., Kim K.H., *et al.* (2006) Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and Insulin-resistant states. *Diabetes*. 55(8):2256-2264.
- Leff T. (2007) AMP-activated protein kinase as a therapeutic target for diabetes. *Drug Discovery Today Therapeutic Strategies*. 4(2):123-127.
- Leng S.H., Lu F.E., Xu L.J. (2004) Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion. *Acta Pharmacol Sin.* 25:496-502.
- Lewis G.F., Uffelman K.D., Szeto L.W. e Steiner G. (1993) Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes*. 42:833-842.
- Lewis G.F. e Steiner G. (1996) Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care*. 19:390-393.
- Li J.P., Defea K. e Roth R.A. (1999) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 274:9351-9356.
- Li Y., Soos T.J., Li X., *et al.* (2004) Protein Kinase C θ Inhibits Insulin Signaling by Phosphorylating IRS1 at Ser¹¹⁰¹. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(44): 45304-45307.

-
- Li C. e Keaney Jr J.F. (2010) AMP-activated protein kinase: a stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 10:111-115.
- Li Y., Ren G., Wang Y.X., *et al.* (2011) Bioactivities of berberine metabolites after transformation through CYP450 isoenzymes. *Journal of Translational Medicine*.9:62-72.
- Lillioja S., Mott D.V., Spraul M., *et al.* (1993) Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*. 329(27):1988-1992.
- Lim C.T., Kola B. e Korbonits M. (2010) AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of Molecular Endocrinology*. 44: 87-97.
- Lochhead P.A., Salt I.P., Walker K.S., *et al.* (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PECK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*. 49(6):896-903.
- Ma X., Egawa T., Kimuro H., *et al.* (2010) Berberine-induced activation of 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and glucose transport in rat skeletal muscles. *Metabolism Clinical and Experimental*. 59:1619-1627.
- Manley S. (2003) Haemoglobin A1c-a marker for complications of type 2 diabetes: the experience from the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). *Clin Chem Lab Med*. 41:1182-1190.
- Mauvais-Jarvis F., Ueki K., Fruman D.A., *et al.* (2000) Reduced expression of the murine p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase improves insulin signaling and ameliorates diabetes. *J Clin Invest*. 109:141-149.
- Martin S., Millar C.A., Lyttle C.T., *et al.* (2000) Effects of insulin on intracellular GLUT4 vesicles in adipocytes: evidence for a secretory mode of regulation. *J Cell Sci*. 113(19):3427-3438.
- McGarry J.D. (2002) Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 51:7-18.
- Moeschel K., Beck A., Weigert C., *et al.* (2004) Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser(318) in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS 1. *J Biol Chem*. 279:25157-25163.

-
- Moller D.E. (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*. 414:821-827.
- Morino k., Petersen K.F. e Shulman G.I. (2006) Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Humans and Their Potential Links With Mitochondrial Dysfunction. *Diabetes*. 55(2):S9-S15.
- Mu J., Brozinick Jr J.T., Valladares O., *et al.* (2001) A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell*. 7:1085-1094.
- Mueckler M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219:713-725.
- Nakae J., Biggs W.H. 3rd, Kitamura T., *et al.* (2002) Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat. Genet.* 32:245-253.
- Bryant N.J., Govers R. e James D.E. (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3:267-277.
- O'Brien R.M. e Granner D.K. (1996) Regulation of gene expression by insulin. *Physiological Reviews*. 76(4):1109-1161.
- Okada T., Kawano Y., Sakakibara T., *et al.* (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes: studies with a selective inhibitor wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269:3568-3573.
- Olson A.L. e Pessin J.E. (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu Rev Nutr.* 16:235-256.
- Pan D.A., Lillioja S., Kriketos A.D., *et al.* (1997) Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*. 46:983-988.
- Pan G., Wang G., Liu X., *et al.* (2002) The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption. *Pharmacology & Toxicology*. 91(4):193-197.
- Pessin J.E., Thurmond D.C., Elmendorf J.S., *et al.* (1999) Molecular basis of insulin stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem*. 274:2593-2596.
- Qiu F., Zhu Z., Kang N., *et al.* (2008) Isolation and identification of urinary metabolites of berberine in rats and human. *Drug Metab. Dispos.* 36:2159-2165.
- Roden M., Krssak M., Stingl H., *et al.* (1999) Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes* 48:358-364.

-
- Saini V. (2010) Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*. 1(3):68-75.
- Seiça R., Susuki K., Santos R., *et al.* (2004) Deficiência primária da secreção de insulina de ilhéus isolados de ratos Goto-Kakizaki, um modelo animal diabético tipo 2 não obeso. *Acta Med Port*. 17:42-48.
- Sena C.M., Louro T., Matafome P., *et al.* (2009) Antioxidant and vascular effects of glicazida in type 2 diabetes rats fed high-fat diet. *Physiol. Res*. 58(2):203-209.
- Sheng M.P., Sun Q. e Wang H. (1993) Studies on the intravenous pharmacokinetics and oral absorption of berberine HCl in beagle dogs. *Sin. Pharmacol. Bull*. 9:64-67.
- Shulman G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigations*. 106(2):171-176.
- Sonwar R., Kim D.Y., Sweeney G., *et al.* (2001) GLUT4 translocation precedes the stimulation of glucose uptake by insulin in muscle cells: potential activation of GLUT4 via p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. J*. 359:639-649.
- Steinberg G.R. e Jorgensen S.B. (2007) The AMP-activated protein kinase: role in regulation of skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Mini Rev. Med. Chem*. 7:519-526.
- Stumvoll M., Goldstein B.J. e van Haeften T.W. (2005) Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 365:1333-1146.
- Summers S.A. (2006) Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. 45:42-72.
- Suzuki K. e Kono T. (1980) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77:254-545.
- Taylor S.I., Accili D. e Imai Y. (1994) Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes*. 43:735-740.
- Tripathy P., Mohanty P., Dhindsa S., *et al.* (2003) Elevation of free fatty acids induce inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. 52(12):2882-2887.
- Tsai P.L. e Tsai T.H. (2004) Hepatobiliary excretion of berberine. *Drug. Metab. Dispos*. 32:405-412.
- Turner N., Li J., Gosby A., *et al.* (2008) Berberine and its more biologically available derivative dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I. A

- mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes*. 57:1414-1418.
- Ueki K., Fruman D.A., Yballe C.M., *et al.* (2003) Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem*. 278: 48453-48466.
- Virkamaki A., Ueki K. e Kahn C.R., (1999) Protein-Protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 103(7):931-943.
- Yang W., Hong Y.H. e Shen X.Q. (2001) Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors. *J Biol Chem*. 276(42):38341-38344.
- Yaworsky K., Somwar R., Ramlal T., *et al.* (2000) Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by a-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*. 43:294-303.
- Ye X., Feng Y., Tong., *et al.* (2009) Hepatoprotective effects of *Coptidis rhizome* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced acute liver hepatotoxicity in rats. *J. Ethnopharmacol*. 124:130-136.
- Yin J., Chen M., Tang J., *et al.* (2004) Effects of berberine on glucose and lipid metabolism in animal experiment. *Chin J Diabetes*. 12:215-218.
- Yin J., Xing H. e Ye J. (2008) Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 57:712-717.
- Yin J., Ye J. e Jia W. (2012) Effects and mechanisms of berberine in diabetes treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2(4):327-334.
- Yu C., Chen Y., Cline G.W., *et al.* (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J. Biol. Chem*. 277:50230-36.
- Xie X., Li W., Lan T., Liu W., *et al.* (2011) Berberine ameliorates hyperglycemia in alloxan-induced diabetic C57BL/6 mice through activation of Akt signaling pathway. *Endocrine Journal*. 58(9):761-768.
- Wang Q., Zhang M., Liang B., *et al.* (2011) Activation of AMP-activated protein kinase is required for berberine-induced reduction of atherosclerosis in mice: the role of uncoupling protein 2. *Plos one*. 6(9):1-9.

-
- White M.F., Shoelson S.E., Keutmann H. e Kahn C.R. (1988) A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J. Biol Chem.* 263:2969-2980.
- Widegren U., Jiang X.J., Krook A.V., *et al.* (1998) Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *FASEB J.* 12:1379-1389.
- Winder W.W., Holmes B.F., Rubink D.S., *et al.* (2000) Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 88(6):2219-2226.
- Wolfrum C., Besser D., Luca E., *et al.* (2003) Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:11624-11629.
- Woods A., Cheung P.C.F., Smith F.C., *et al.* (1996) Characterization of AMP-activated protein kinase β subunit and γ subunit – assembly of the heterotrimeric complex *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 271:10282–10290.
- Zhang B.J., Xu D., Guo Y., *et al.* (2008) Protection by and anti-oxidant mechanism of berberine against rat liver fibrosis induced by multiple hepatotoxic factors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35:303-309.
- Zhang H., Wei J., Xue R., *et al.* (2010) Berberine lowers glucose in type 2 diabetes mellitus patients through increasing receptor expression. *Metabolism Clinical and Experimental.* 59:285-292.
- Zhang Q., Xiao X., Feng K., *et al.* (2011) Berberine Moderates Glucose and Lipid Metabolism through Multipathway Mechanism. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2011:1-10.
- Zhao H., Sui Y., Qiao C., *et al.* (2012) Sustained antidiabetic effects of a berberine containing chinese herbal medicine through regulation of hepatic gene expression. *Diabetes.* 3950:1-23.
- Zhao X., Gan L., Pan H., *et al.* (2004) Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem J.* 378:839-849.
- Zhou L., Yang Y., Wang X., *et al.* (2007) Berberine stimulates glucose transport though a mechanism distinct from insulin. *Metabolism Clinical and Experimental.* 56:405-412.

- Zhou J-Y., Zhou S-W., Zhang K.B., *et al.* (2008) Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats. *Biol Pharm Bull.* 31:1169-1176.
- Zhou J-Y. e Zhou S-W. (2011) Protective effect of berberine on antioxidante enzymes and positive transcription elongation factor b expression in diabetic rat liver. *Fitoterapia.* 82:184-189.
- Zuo F., Nakamura N., Akao T., *et al.* (2006) Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* 34:2064-2072.