

## **TÍTULO**

### **INSULINO-RESISTÊNCIA E INFLAMAÇÃO: EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA EM RATOS IDOSOS DIABÉTICOS TIPO 2**

**INSULIN RESISTANCE AND INFLAMMATION: EFFECTS OF CALORIC RESTRICTION IN TYPE 2 DIABETIC AGED RATS**

Cristiana Mendes<sup>\*1</sup>, Paulo Matafome<sup>1</sup>, Teresa Louro<sup>1</sup>, Cristina Sena<sup>1</sup>, Raquel Seça<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

#### **Contactos\***

**Morada:** Pólo III da Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina, Subunidade 1, 1º andar, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 Coimbra, Portugal.

**E-mail:** cristianacmm@gmail.com

#### **Trabalho financiado por:**

IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)

## RESUMO

**Introdução:** A diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), uma doença metabólica que resulta de insulino-resistência (IR) e incapacidade da célula  $\beta$  segregar adequadamente insulina, representa um dos mais importantes desafios para a saúde pública do mundo ocidental. A IR é um estado metabólico anormal precoce e tem várias causas ainda pouco conhecidas. É aceite a ligação entre IR, inflamação e obesidade, no entanto, nem todos os doentes com DMT2 são obesos, ainda que, nestes doentes, a ativação crónica do sistema imunitário esteja, também, presente e relacionada com IR. A restrição calórica (RC), uma intervenção dietética baixa em calorias, sem malnutrição, é útil na prevenção e controle da DMT2. No entanto, não são, ainda, compreendidos os efeitos da RC na DMT2 não obesa.

**Objetivo:** Avaliar, na DMT2 e de forma independente da obesidade, ratos Goto-Kakizaki (GK) idosos, os efeitos da RC na IR hepática e na inflamação local.

**Métodos:** Foram estudados quatro grupos experimentais de ratos com 12 meses de idade. Dois grupos controlo, alimentados *ad libitum*: ratos Wistar normais (W) e GK – um modelo de DMT2 espontânea, não obesa; e dois grupos submetidos a restrição calórica durante 12 semanas (WRC e GKRC).

Foi feita avaliação metabólica sistémica, sendo a análise de vários parâmetros (JNK, Akt/PKB e AMPK) no tecido hepático realizada por *Western Blot*.

**Resultados:** A RC conduziu a aumento da tolerância à glicose e diminuição dos níveis de HbA<sub>1C</sub>, triglicédeos e ácidos gordos livres.

A RC também se mostrou benéfica em parâmetros envolvidos na inflamação e IR hepáticos: diminuição da expressão de JNK e aumento da expressão de Akt e de AMPK.

**Conclusão:** A RC melhora o perfil glicídico e lipídico da DMT2. Os seus efeitos em parâmetros de inflamação e energéticos/ de IR a nível hepático sugerem o envolvimento do fígado nos benefícios metabólicos da RC.

## **Palavras-chave**

Diabetes *mellitus* tipo 2, insulino-resistência, inflamação, restrição calórica, fígado.

## **Abreviaturas:**

DMT2, diabetes *mellitus* tipo 2; IR, insulino-resistência; RC, restrição calórica; HDL, lipoproteína de alta densidade; TG's, triglicerídeos; AGL, ácidos gordos livres; HbA<sub>1c</sub>, hemoglobina glicada; IMC, índice de massa corporal; JNK, “*c-Jun N-terminal kinase*”; Akt/PKB, proteína cinase B; AMPK, cinase ativada por AMP; IRS-1, substrato do recetor da insulina-1; PI3K, cinase de PI<sub>3</sub>; MAPK, cinase das proteínas ativadoras da mitogénese; mTor, proteína-cinase alvo da rapamicina em mamíferos; PKC, proteína cinase C; IKK, cinase do inibidor do NF- $\kappa$ B; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade.

## **ABSTRACT**

**Background:** Type 2 diabetes mellitus (T2DM), a metabolic disease characterized by insulin resistance (IR) and  $\beta$ -cell dysfunction, represents one of the most important challenges for public health in the western world. IR is an early abnormal metabolic state and has several causes that are still poorly understood. The link between IR, inflammation and obesity is widely accepted. However, not all patients with T2DM are obese. Even so, in these patients, the chronic activation of immune system is also present and associated with IR.

Caloric restriction (CR), a dietary intervention low in calories in the absence of malnutrition, is useful in the prevention and management of T2DM. Nevertheless, the mechanisms underlying the effects of CR in non obese T2DM are not clarified.

**Purpose:** Evaluate, in T2DM independently of obesity, the effects of caloric restriction on hepatic IR and local inflammation in Goto-Kakizaki (GK) aged rats. GK is a spontaneous non-obese type 2 diabetic animal model.

**Experimental approach:** Twelve-month-old Wistar normal (W) and GK rats were separated in four groups: two control groups (W and GK) feed *ad libitum* and two groups submitted to caloric restriction (WRC and GKRC) during 12 weeks.

Systemic metabolic profile was determined and the assessment of several hepatic tissue parameters (JNK, Akt/PKB e AMPK) was made by Western Blot.

**Key results:** CR led to an improvement of glucose tolerance and decreased levels of HbA1C, triglycerides and free fatty acids.

CR was also beneficial in parameters involved in inflammation and hepatic IR: decreased expression of JNK and increased expression of Akt and AMPK.

**Conclusions:** CR improves glucose and lipid profile of T2DM. Its effects on hepatic parameters of inflammation and energy/IR suggest the involvement of the liver in the metabolic benefits of CR.

## **Keywords**

Type 2 diabetes *mellitus*, insulin resistance, inflammation, caloric restriction, liver.

## **Abbreviations**

T2DM, type 2 diabetes mellitus; IR, insulin-resistance; CR, caloric restriction; HDL, High-density lipoprotein; TG's, triglycerides; AGL, free fatty acids; HbA<sub>1c</sub>, Glycated hemoglobin; IMC, body mass index; JNK, c-Jun N-terminal kinase; Akt/PKB, protein kinase B; AMPK, "5' adenosine monophosphate-activated protein kinase"; IRS-1, Insulin receptor substrate 1; PI3K, PI<sub>3</sub> Kinase; MAPK, Mitogen-activated protein kinases; mTor, mammalian target of rapamycin; PKC, Protein kinase C; IKK, I $\kappa$ B kinase; VLDL, very low density lipoprotein.

## INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença metabólica que resulta de insulino-resistência (IR) e incapacidade da célula  $\beta$  segregar insulina de forma a manter os seus efeitos, nomeadamente a normoglicemia.<sup>[1-7]</sup>

A DMT2 afigura-se como um dos mais importantes desafios para a saúde pública do mundo ocidental, atingindo mais de 371 milhões de pessoas em todo o mundo, o que representa cerca de 8,3% da população mundial, número este que continua a crescer. No ano de 2011, em Portugal, a prevalência da DMT2 situava-se nos 12,7 % da população com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, verificando-se uma correlação direta entre o aumento da prevalência da DMT2 e o envelhecimento dos indivíduos.<sup>[2]</sup>

A IR pode definir-se como um estado metabólico anormal precoce em que as células alvo, nomeadamente do tecido muscular, fígado e tecido adiposo, têm uma resposta insuficiente aos níveis normais da insulina circulante. Neste estágio, a manutenção da normoglicemia é garantida através de hiperinsulinismo compensatório. Na presença de deficiência das células  $\beta$  (disfunção e redução da massa celular) não há essa compensação, o que resulta em hiperglicemia.<sup>[1]</sup> As causas de IR são várias e ainda não muito bem compreendidas. Admite-se que fatores genéticos interatuem com fatores ambientais, sendo que, destes, os mais importantes são: a obesidade, o sedentarismo e a idade.<sup>[3-8]</sup>

A ligação entre obesidade, IR e inflamação crónica de baixo grau é, atualmente, aceite.<sup>[3-5, 8-13]</sup> Nem todos os doentes com DMT2 são obesos, mas a ativação crónica do sistema imunitário, na forma não obesa, está igualmente presente e relacionada com IR. Para além disso, pacientes com DMT2 não obesos ostentam, geralmente, obesidade abdominal e aumento da massa gorda total, não obstante o valor normal de Índice de Massa Corporal (IMC).<sup>[5, 6]</sup> Sabe-se que a localização do tecido adiposo é determinante nas funções metabólicas e hormonais que

desempenha.<sup>[11, 12]</sup> A obesidade abdominal associa-se a IR, independentemente do grau de obesidade total.<sup>[6]</sup>

Através de mecanismos complexos de regulação celular, a disponibilidade nutricional afeta a sensibilidade à insulina.<sup>[3, 4, 10, 12, 13]</sup> Deste modo, um balanço energético positivo, como o que acontece de forma crónica na obesidade, leva a IR. Se, por um lado, nos doentes obesos, a restrição calórica (RC) promove o aumento da sensibilidade à insulina,<sup>[3, 9]</sup> não são ainda completamente compreendidos os efeitos da RC na IR, em indivíduos com DMT2 não obesa. Os ratos Goto-Kakizaki (GK), um modelo de DMT2 espontânea não obesa, apresentam alterações da função e massa de células  $\beta$ , IR, bem como, inflamação crónica associada à disfunção do tecido adiposo.<sup>[14-16]</sup>

Trabalhos anteriores publicados pelo nosso laboratório demonstraram alguns dos efeitos positivos da RC sobre parâmetros de inflamação, IR e de *stress* oxidativo no tecido muscular de ratos GK adultos.<sup>[17, 18]</sup>

Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar, na DMT2 e de forma independente da obesidade (ratos GK idosos), os efeitos da RC na IR hepática e na inflamação local.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Reagentes Químicos e Imunológicos**

Todos os sais e solventes orgânicos utilizados na preparação das soluções possuem o mais alto grau de pureza disponível à data de aquisição às empresas seguintes: Merck Darmstad – Alemanha, Sigma-Aldrich – EUA ou à Pancreac Química SA- Espanha. Os anticorpos utilizados foram: Akt Rabbit Antibody, SAPK/JNK Rabbit Antibody e AMPK $\alpha$  Rabbit Antibody (Cell Signalling, USA).

### **Modelos Animais**

Neste estudo foram usados dois modelos animais: ratos Wistar normais (W) e ratos GK (um modelo de diabetes tipo 2 espontânea, não-obesa) oriundos da colônia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. Os animais foram mantidos sob atmosfera controlada: temperatura (21-24°C), humidade (50-60%), ventilação adequada e com ciclos alternados de luz e obscuridade (12:12h), bem como, acesso livre a água e ração (dieta *standard* laboratorial A04-Panlab, Barcelona, Espanha).

Ratos de ambas as estirpes, com 12 meses de idade, foram separados em quatro grupos experimentais (n=7 a 10, por grupo): dois grupos alimentados *ad libitum* com dieta *standard* (grupos W e GK) e dois grupos submetidos a restrição calórica: 10% nas duas primeiras semanas, 25% nas duas semanas seguintes e 35% até perfazer 12 semanas (grupos WRC e GKRC).

### **Parâmetros sistémicos**

O peso corporal foi determinado em jejum no final do período de restrição calórica.

A glicemia em sangue total foi determinada através da colheita da amostra por punção na veia da cauda, no final do período de restrição calórica, através do método da glicose-oxidase



utilizando um glicómetro e tiras-teste (*Glucometer Elite* – Bayer SA, Portugal). A concentração de glicose em jejum foi determinada após 16-18 horas de jejum. A prova de tolerância à glicose intraperitoneal (PTGIP) foi realizada após esta determinação: a que se seguiu a administração intraperitoneal de 1,8g/Kg de glicose a 30% (Braun, Queluz de Baixo, Portugal), com colheitas aos 60 e aos 120 minutos. Os níveis de hemoglobina-A<sub>1C</sub> (HbA<sub>1C</sub>) foram determinados no sangue total da veia da cauda, usando um analisador automático (*DCA 2000 Analyser*, Bayer, Health Care Diagnostics Division).

A insulinemia em jejum foi determinada por técnica de ELISA competitiva (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).<sup>[19]</sup>

Os níveis de colesterol (total e HDL) e triglicerídeos (TG's), bem como as provas hepáticas, foram determinados usando *kits* comerciais (Olympus-Diagnóstica, Portugal, Produtos de Diagnóstico SA, Portugal).

A concentração plasmática de ácidos gordos livres (AGL) no plasma (mM) foi determinada por espectrofotometria, utilizando o Half-micro test, Roche Diagnostic, Alemanha.

### **Colheita de Sangue**

Para a determinação posterior de vários parâmetros sanguíneos, o sangue foi colhido, por punção cardíaca, no dia do sacrifício, com os animais anestesiados com cloridrato de quetamina (75 mg/kg, i.m., Parke-Davis, Ann Arbor, MI, EUA) e cloridrato de clorpromazina (2.65 mg/kg, i.m., Lab. Vitória, Amadora, Portugal). O sangue foi centrifugado (2500rpm, 10 min, a 4°C) e o soro e plasma mantidos a -20°C, até ao processamento das amostras.

## **Colheita dos fígados**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, após as colheitas de sangue. Os fígados foram recolhidos, lavados numa solução isotónica (0,9% NaCl) e imediatamente congelados em azoto líquido e armazenados, em seguida, a -80°C.

## **Preparação dos homogeneizados de fígado**

Foram obtidas porções transversais do tecido, com cerca de 200 mg e homogeneizadas num *potter* em 2 mL de tampão de lise (Tabela 1), tendo sido, posteriormente, sonicadas. De seguida, efetuaram-se duas centrifugações (20', 14000rpm, 4°C), recolhendo-se, sucessivamente, o sobrenadante. A concentração de proteína foi calculada pelo método do BCA (*BCA protein assay*, Pierce, EUA), as amostras foram alíquotadas e, depois de adicionado tampão *Sample* (Tabela 1), armazenadas a -80°C para análises subseqüentes.

## **Western Blot**

Para efetuar a identificação e quantificação das proteínas Akt total, JNK total e AMPK total, utilizou-se a técnica de *Western Blot*. A  $\beta$ -actina serviu como controlo interno da quantidade de proteína das amostras. A quantificação das bandas foi calculada com o programa Image Quant, Molecular Dynamics, EUA.

Os géis de acrilamida para separação das proteínas por peso molecular foram polimerizados no sistema de polimerização (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad, EUA), com os tampões *Resolving* e *Stacking* (Tabela 1). Após terem sido desnaturadas e sonicadas, as amostras foram colocadas nos géis, que correram no sistema apropriado (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad, EUA), com tampão *Running* (Tabela 1), com padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards, Dual Color*, Bio-Rad, EUA).

As proteínas foram transferidas para membranas PVDF (*Polyvinylidene fluoride membrane*, Bio-Rad, EUA), previamente ativadas com metanol, no sistema de transferência (*Mini Trans-Blot*, Bio-Rad, EUA), a amperagem constante de  $\pm 300\text{mA}$ , em tampão *CAPS* (Tabela 1).

As membranas foram bloqueadas com solução TBST-BSA 5% (Tabela 1), a temperatura ambiente, durante duas horas e depois lavadas com TBST (Tabela 1). Após o bloqueio, as membranas incubaram durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$  com os respectivos anticorpos primários. Depois lavaram-se com TBST e incubaram-se com os respectivos anticorpos secundários, com agitação constante e à temperatura ambiente, durante 2 horas.

Por último, as membranas foram incubadas com o substrato enzimático ECF (Mouse *ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, UK) e reveladas com recurso ao leitor de fluorescência (Typhoon, GE Healthcare, USA).

**Tabela 1:** Soluções utilizadas na técnica de *Western Blot*.

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

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (e.p.m.). Os dados obtidos foram analisados pelo teste One way ANOVA, sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados significativos.

## **RESULTADOS**

### **1. PESO CORPORAL, PERFIL GLICÉMICO E INSULINEMIA**

Aos quinze meses, o peso corporal dos ratos GK é menor que o peso dos ratos W, ainda que esta diferença não seja estatisticamente significativa. Os ratos GK submetidos a RC, apresentam uma diminuição estatisticamente significativa do seu peso, quando comparados com os grupos W ( $p < 0,001$ ), GK ( $p < 0,05$ ) e WRC ( $p < 0,01$ ) (Tabela 2).

A glicemia em jejum dos ratos GK é significativamente superior à dos ratos W ( $p < 0,001$ ), alteração mantida com a RC ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significativas da insulinemia em jejum, entre os grupos estudados (Tabela 2).

**Tabela 2:** Peso corporal (g), glicemia em jejum (mg/dL) e insulinemia em jejum (pmol/L)

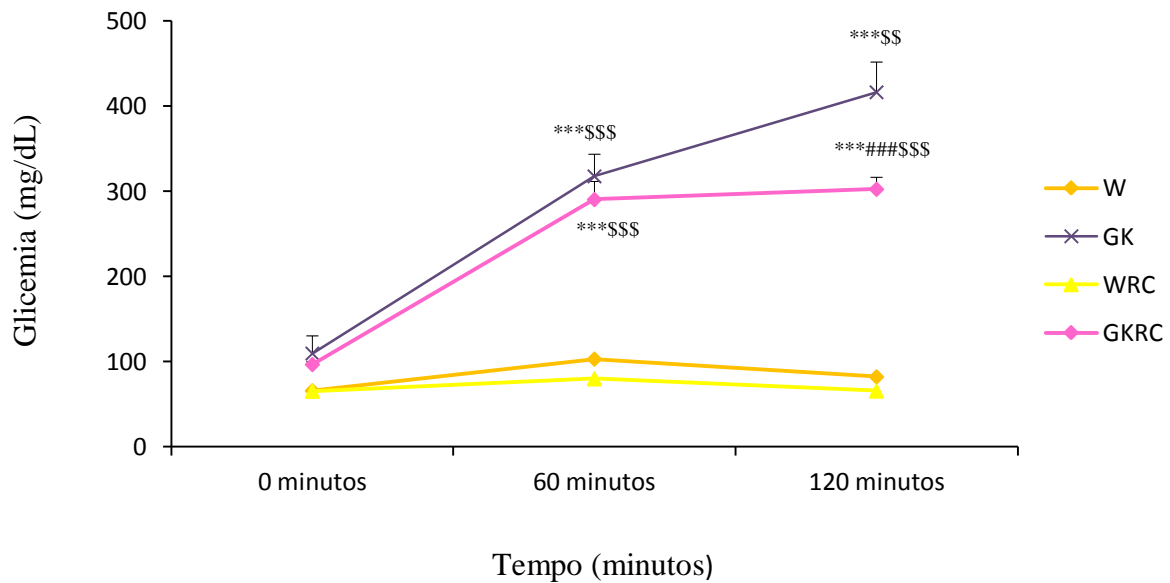
	<b>W</b>	<b>GK</b>	<b>WRC</b>	<b>GKRC</b>
<b>Peso (g)</b>	434,81±19,19	377,7±6,72	406,31±30,05	292,86±8,85
				***#\$\$
<b>Glicemia em jejum (mg/dL)</b>	66,17±1,03	95,33±3,43	69,5±1,69	105,43±5,47
		***		***\$\$
<b>Insulinemia em jejum (pmol/L)</b>	62,7±4,5	52,5±6,9	67,4±16,6	56,9±8,1

W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

Os resultados são apresentados como média ± e.p.m., n= 4-10/grupo.

\* Diferente de W; # Diferente de GK; \$ Diferente de WRC; 1 símbolo p<0,05; 2 símbolos p<0,01; 3 símbolos p<0,001; (teste ANOVA).

Os ratos GK apresentam intolerância marcada à glicose. O valor de glicemia às 2 horas apresenta uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), quando comparamos os ratos do grupo GKRC com os respectivos controles GK (Figura 1).



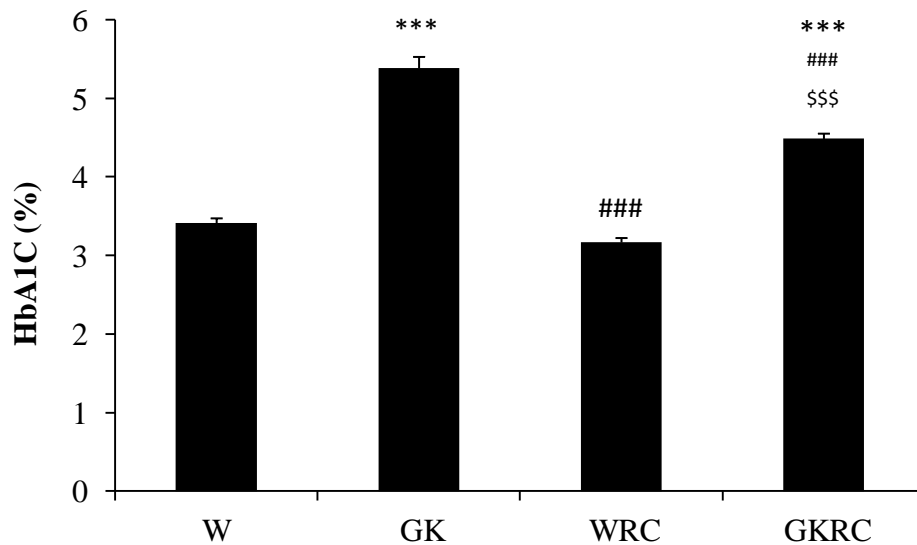
**Figura 1 – Prova de tolerância à glicose intraperitoneal:** a glicemia foi determinada no sangue total pelo método da glicose-oxidase: aos 0, 60 e 120 minutos.

W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 7-10$ /grupo.

\* Diferente de W; # Diferente de GK; \$ Diferente de WRC; 3 símbolos  $p < 0,001$ ; (teste ANOVA).

Os níveis de HbA<sub>1c</sub> são mais elevados nos ratos GK quando comparados com os ratos W (p<0,001) e diminuem significativamente com a RC (p<0,001) (Figura 2).



**Figura 2 – HbA<sub>1c</sub> (%).**

W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

Os resultados são apresentados como média ± e.p.m., n= 7-9/grupo.

\* Diferente de W; # Diferente de GK; \$ Diferente de WRC; 3 símbolos p<0,001; (teste ANOVA).



## **2. PERFIL LIPÍDICO**

Em relação aos ratos W, os ratos GK revelam valores plasmáticos mais elevados de colesterol total e HDL ( $p < 0,001$ ), TG's ( $p < 0,01$ ) e AGL ( $p < 0,01$ ) (Tabela 3).

A RC conduz, nos ratos Wistar (grupo WRC), ao aumento dos níveis de colesterol total ( $p < 0,05$ ) e HDL ( $p < 0,001$ ). No que concerne aos TG's, verifica-se uma redução estatisticamente significativa no grupo GKRC, relativamente aos seus controlos ( $p < 0,001$ ) e ao grupo W ( $p < 0,01$ ). A RC induz uma diminuição dos valores de AGL no plasma nas duas estirpes, comparativamente aos respetivos controlos ( $p < 0,001$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Concentrações séricas de colesterol total e HDL (mg/dL); triglicerídeos (mg/dL) e ácidos gordos livres no plasma (mM).

	<b>W</b>	<b>GK</b>	<b>WRC</b>	<b>GKRC</b>
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	66,4±0,9	117,4±6,3	90,9±5,8	111,7±5,2
		***	***	***\$
<b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>	35,4±2,2	80,9±5,1	59,0±4,0	78,3±3,5
		***	***##	***\$\$
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	78,8±4,09	117,1±7,53	57,4±5,08	47,7±3,2
		**	###	###
<b>Ácidos gordos livres (mM)</b>	0,75±0,11	1,37±0,09	0,16±0,04	0,76±0,09
		**	#####	#####

W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

Os resultados são apresentados como média ± e.p.m., n= 5-8/grupo.

\* Diferente de W; # Diferente de GK; \$ Diferente de WRC; 1 símbolo p<0,05; 2 símbolos p<0,01; 3 símbolos p<0,001; (teste ANOVA).

### 3. PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

Relativamente às provas de função hepática, a única alteração a assinalar é a elevação dos níveis de Fosfatase Alcalina nos grupos de ratos GK e GKRC em comparação com os ratos W ( $p < 0,001$ ). A RC não induziu alterações dos restantes parâmetros (Tabela 4).

**Tabela 4:** Concentrações séricas de albumina (g/dL), T.G.O. (U/L), T.G.P. (U/L), Fosfatase Alcalina (U/L),  $\gamma$ -G.T. (U/L).

	W	GK	WRC	GKRC
<b>Albumina (g/dL)</b>	2,4 $\pm$ 0,05	2,8 $\pm$ 0,06	2,7 $\pm$ 0,04	2,9 $\pm$ 0,06
<b>T.G.O. (U/L)</b>	164,4 $\pm$ 36,3	118,0 $\pm$ 8,0	139,4 $\pm$ 11,2	99,6 $\pm$ 7,1
<b>T.G.P. (U/L)</b>	40,2 $\pm$ 2,1	44,0 $\pm$ 3,4	61,3 $\pm$ 9,2	46,3 $\pm$ 3,9
<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b>	67,0 $\pm$ 12,3	132,9 $\pm$ 7,8 ***	77,3 $\pm$ 7,7	147,0 $\pm$ 9,0 ***
<b><math>\gamma</math>- G.T. (U/L)</b>	0,8 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1

W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

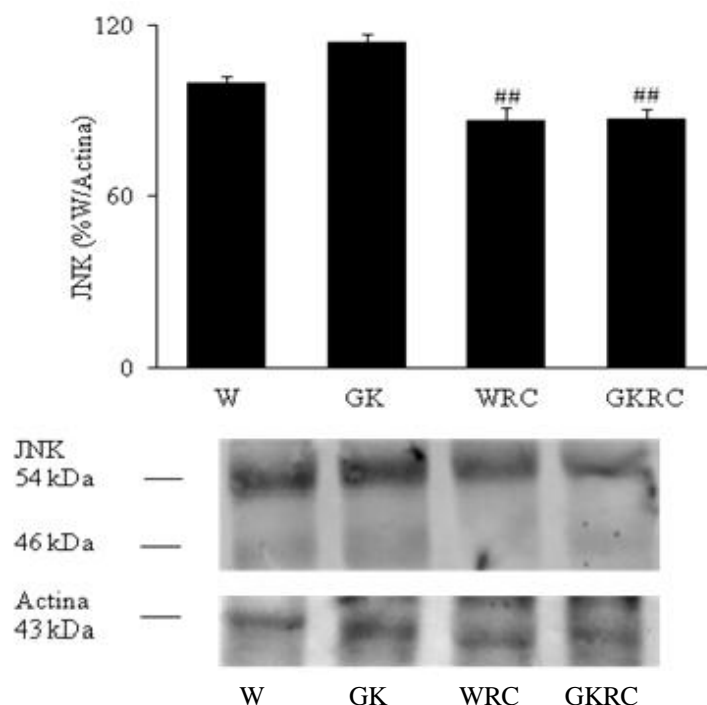
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m., n= 4-8/grupo.

\* Diferente de W; 3 símbolos  $p < 0,001$ ; (teste ANOVA).

## 4. MARCADORES INFLAMATÓRIOS HEPÁTICOS

### 4.1 “*c-Jun N-terminal kinase*” – JNK

Nos grupos submetidos a RC, os valores de JNK (uma cinase que participa em vias de regulação da insulina e em vias pró-inflamatórias), no tecido hepático, diminuem tanto no grupo WRC, como no grupo GKRC, comparativamente ao grupo de ratos GK ( $p < 0,01$ ) (Figura 3).



**Figura 3 – JNK no tecido hepático:** quantificação de JNK (%W/Actina) no tecido hepático avaliada por *Western Blot*, com marcação específica para esta proteína e respetiva membrana.

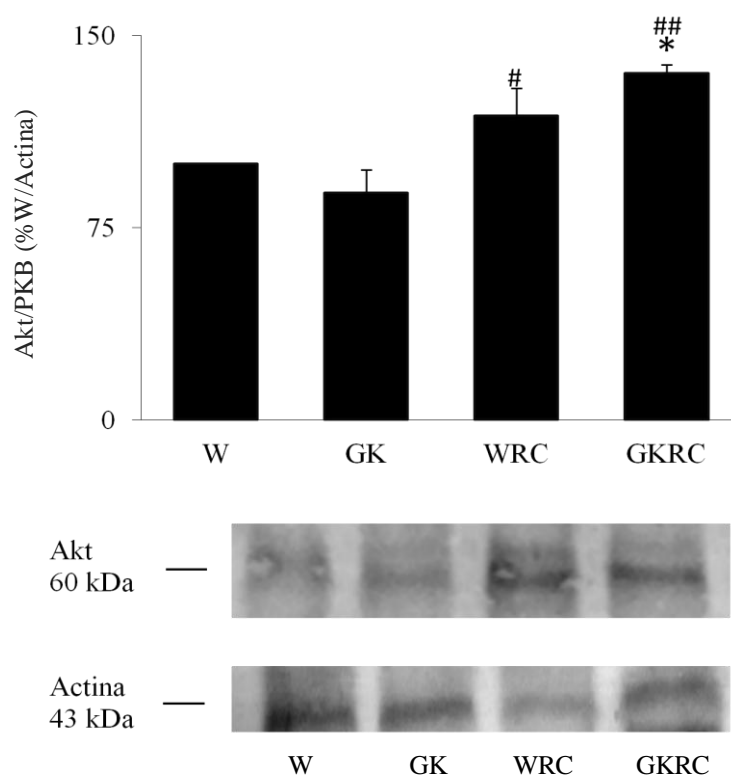
W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 4-5$ /grupo.

<sup>#</sup> Diferente de GK; 2 símbolos  $p < 0,01$ ; (teste ANOVA).

## 4.2 “Protein Kinase B” – Akt/PKB

A RC induz alterações da Akt/PKB (uma cinase que participa na via da regulação da insulina) em ambas as estirpes. A percentagem é significativamente maior quando se compara o grupo WRC com o grupo GK ( $p < 0,05$ ) e o grupo GKRC com os grupos controlo:  $p < 0,05$  versus W e  $p < 0,01$  versus GK (Figura 4).



**Figura 4 – Akt no tecido hepático:** quantificação de Akt/PKB (em %W/Actina) no tecido hepático avaliada por *Western Blot*, com marcação específica para esta proteína e respetiva membrana.

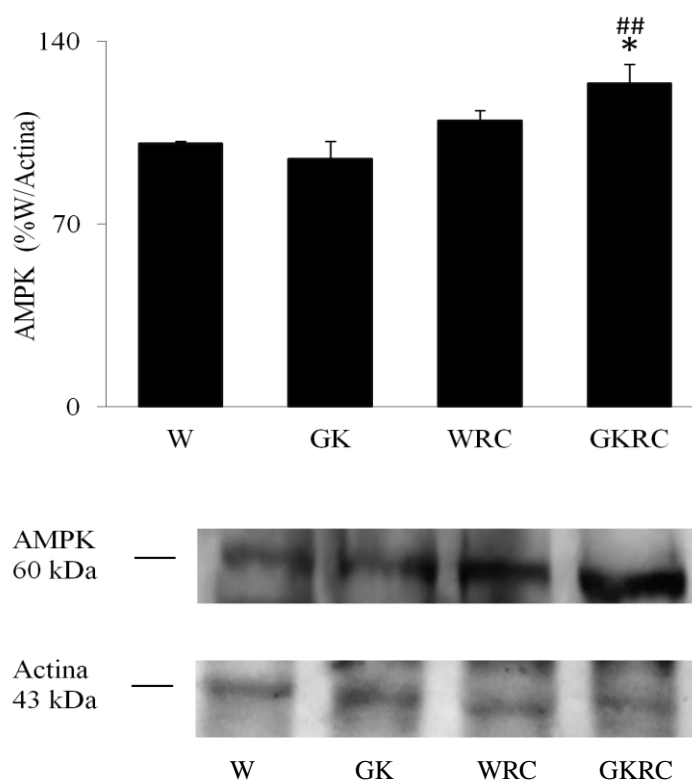
W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 4-5$ /grupo.

\* Diferente de W; # Diferente de GK; 1 símbolo  $p < 0,05$ ; 2 símbolos  $p < 0,01$ ; (teste ANOVA).

### 4.3. “5' Adenosine monophosphate-activated protein kinase” - AMPK

A RC induz um aumento da percentagem de AMPK (uma proteína sensor da energia celular) nos ratos GK (grupo GKRC)  $p < 0,05$  versus ratos W e  $p < 0,01$  versus ratos GK (Figura 5).



**Figura 5 – AMPK no tecido hepático:** quantificação de AMPK (em %W/Actina) no tecido hepático avaliada por *Western Blot*, com marcação específica para esta proteína e respetiva membrana.

W: ratos Wistar; GK: ratos Goto-Kakizaki; WRC: ratos Wistar com restrição calórica (durante 12 semanas); GKRC: ratos Goto-Kakizaki com restrição calórica (durante 12 semanas).

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m.,  $n = 4-5$ /grupo.

\* Diferente de W; # Diferente de GK; 1 símbolo  $p < 0,05$ ; 2 símbolos  $p < 0,01$ ; (teste ANOVA).

## DISCUSSÃO

A RC pode definir-se como uma intervenção dietética baixa em calorias, porém adequada em nutrientes. O interesse na RC advém dos resultados obtidos em múltiplos estudos, em diversas espécies animais, incluindo roedores e primatas, que mostraram os seus benefícios em doenças relacionadas com a idade, tais como DMT2, obesidade, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e cancro, bem como no aumento da esperança média e máxima de vida. Ainda que os mecanismos que conduzem a estes efeitos não sejam bem conhecidos, admite-se que possam envolver alterações significativas no metabolismo energético, na sensibilidade à insulina, no *stress* oxidativo e mudanças funcionais, quer no sistema neuroendócrino, quer no sistema nervoso simpático.<sup>[20-22]</sup>

Sabe-se que a RC é útil, e uma das armas terapêuticas base, para a prevenção e controlo da DMT2 tanto na forma obesa, como na não-obesa. Enquanto na DMT2 obesa é, atualmente, aceite que os efeitos benéficos da RC advêm da diminuição da massa de tecido adiposo, com a conseqüente diminuição da produção de fatores pró-inflamatórios daí decorrente, não se conhecem, ainda, os efeitos da RC na forma não obesa.<sup>[6, 8, 23]</sup>

Os ratos GK, e de acordo com trabalhos anteriores do nosso grupo, apresentaram moderada hiperglicemia em jejum, marcada intolerância à glicose e aumento da HbA<sub>1C</sub>, do colesterol total e HDL, dos TG's e dos AGL.<sup>[14, 15, 17, 18]</sup>

Demonstrámos, também, que a RC nos ratos GK leva ao aumento da tolerância à glicose, à diminuição dos níveis de HbA<sub>1C</sub>, TG's e AGL. De acordo com os estudos anteriores efetuados pelo nosso grupo em ratos GK com 6 meses de idade conduziu a um agravamento da glicemia em jejum, tanto em ratos GK como em ratos Wistar, sugerindo um aumento da produção hepática de glicose, em resposta à RC severa.<sup>[17, 18]</sup>

Evidenciámos também, neste trabalho, os efeitos benéficos da RC em parâmetros envolvidos na inflamação e IR hepáticos, tais como: diminuição da expressão de JNK e aumento da expressão de Akt e de AMPK.

A insulina é uma hormona pleiotrópica com diversas funções no metabolismo celular, sendo especialmente importante na regulação do metabolismo da glicose, ao atuar particularmente no fígado e nos tecidos muscular e adiposo.<sup>[3, 4, 13]</sup>

A ação da insulina inicia-se através da sua ligação ao respetivo recetor, desencadeando uma cascata de eventos complexos. Muito resumidamente, esta ligação conduz à fosforilação em tirosina dos substratos do recetor de insulina (IRS -1-4 – “*insulin receptor substrates*”), de que resulta a ativação de duas vias intracelulares principais: a via da fosfatidil-inositol 3 cinase (PI3K) – Akt/PKB, grande responsável pelas ações metabólicas da insulina e a via das cinases das proteínas ativadoras da mitogénese (MAPK – “*Ras-mitogen activated protein kinase*”) que regula a expressão génica e interatua com a via PI3K-Akt/PKB a fim de controlar o crescimento e a diferenciação celulares.<sup>[4, 13, 24, 25]</sup>

A ação da insulina é inibida pela fosforilação em resíduos de serina em locais específicos do IRS-1 quando são ativadas as vias da JNK, IKK, PKC e mTOR. Múltiplos fatores, como por exemplo AGL e citosinas, parecem aumentar a fosforilação inibitória em serina do IRS-1 e, assim, induzir IR. Constitui-se, desta forma, uma ligação entre vias de sinalização da insulina e vias pro-inflamatórias, sendo a JNK uma das mais importantes vias para o estabelecimento desta relação. Por outro lado, se for ativada a via da Akt/PKB, pode desencadear o feedback positivo da sinalização da insulina (Figura 6).<sup>[3, 4, 26, 27]</sup>



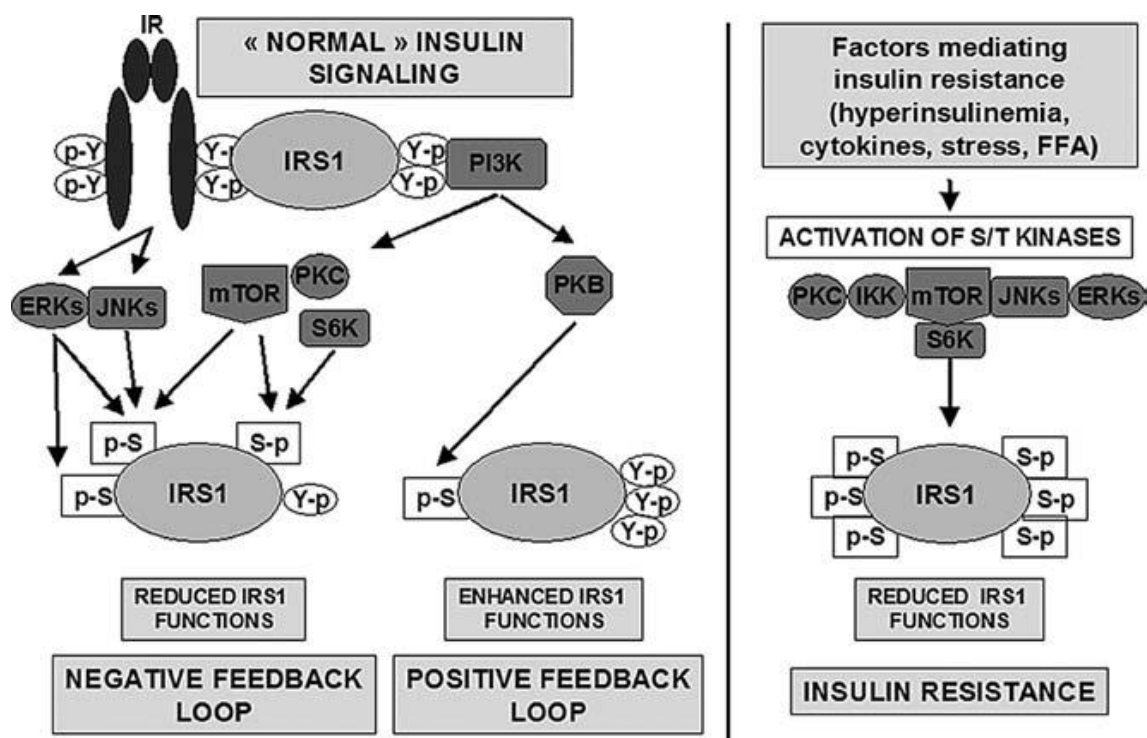


Figura 6 – (Gual, 2005) Vias de retrocontrolo da ação da insulina.

IR, recetor da insulina; IRS-1, substrato do recetor da insulina-1; PI3K, cinase de PI<sub>3</sub>; ERKs, cinase regulada por sinais extracelulares; JNK, c-Jun N-terminal cinase; mTor, proteína cinase alvo da rapamicina em mamíferos; PKC, proteína cinase C; PKB, proteína cinase B; IKK, cinase do inibidor do NF-κB; S6K, cinase S6; p-S, locais de fosforilação em serina; Y-p, locais de fosforilação em tirosina; FFA's, ácidos gordos livres.

As JNK são um grupo de 3 proteínas JNK -1, -2 e -3, pertencentes à família das MAPK e, devido ao seu papel de regular metabólico central, têm sido referidas como uma das moléculas mais importantes na associação entre IR, DMT2 e obesidade.<sup>[28]</sup> Hirosumi *et al.* (2002) verificou que a atividade da JNK, mais especificamente da isoforma JNK-1, se encontrava aumentada em vários tecidos como o fígado, o tecido adiposo e o tecido muscular de ratos obesos e insulino-resistentes. As suas experiências mostraram, também, que modelos *knock-out* para a expressão de JNK-1, obesos, apresentavam uma melhoria dos índices de IR,

um aumento da capacidade de sinalização do IRS-1, bem como, resistência ao desenvolvimento da obesidade.<sup>[29]</sup> Outros estudos corroboram estas conclusões, demonstrando que a inibição da JNK induz diminuição da glicemia e aumento da sensibilidade à insulina em modelos animais obesos e diabéticos, sugerindo o potencial uso terapêutico de inibidores específicos da via da JNK, no tratamento da DMT2.<sup>[30]</sup>

De acordo com estes dados, a melhoria do perfil glicídico, em resposta à RC, verificada no nosso estudo, poderá ter por base a diminuição da expressão de JNK e o aumento da Akt/PKB.

Uma outra via com um papel fulcral na homeostase da glicose é a via das cinases ativadas por AMP (AMPK), que tem sido descrita como um sensor da energia das células, por mediar a adaptação destas às variações nutricionais e ambientais que levam à depleção dos níveis de ATP intracelular. Esta via pode ser ativada através de uma miríade de estímulos, tais como, jejum, hipoxia, *stress* oxidativo e contração muscular, em resposta ao aumento do *ratio* intracelular AMP/ATP.<sup>[31, 32]</sup> Na maioria das células, a AMPK só é ativada em resposta a uma depleção de glicose quando a concentração desta é muito baixa; todavia, em células especializadas como os hepatócitos, que expressam GLUT 2 e glicocinase, a AMPK é regulada pelas flutuações fisiológicas da glicose. Ainda que os canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP possam ser os principais sensores destas células, a AMPK parece desempenhar, também, funções na regulação da glicose.<sup>[31]</sup> A AMPK pode, adicionalmente, ser ativada por diferentes hormonas como a leptina ou a adiponectina, apesar de os mecanismos não serem, atualmente, completamente conhecidos.<sup>[25]</sup>

A ativação da AMPK implica ativação alostérica e fosforilação prévia em resíduos de tirosina. Desta decorre a inibição de vias anabólicas como a síntese de ácidos gordos no fígado e no tecido adiposo, a síntese hepática de colesterol, a síntese proteica no fígado e no músculo, bem como a secreção de insulina pelas células β-pancreáticas; adicionalmente, a AMPK ativa

vias catabólicas, tais como captação e oxidação de glicose e de ácidos gordos, e ainda a biogénese mitocondrial, em múltiplos tecidos.<sup>[25]</sup> Para além destes efeitos diretos via fosforilação de enzimas metabólicas, a AMPK exerce efeitos a longo prazo, através da modulação da transcrição de genes específicos implicados no metabolismo energético.<sup>[31, 32]</sup>

Devido a estas características, a via da AMPK apresenta-se como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de IR e DMT2. A metformina, um medicamento antidiabético, sensibilizador da insulina, amplamente usado na prática clínica, funciona, em parte, através da ativação da AMPK,<sup>[31, 32]</sup> sendo porém, controverso o mecanismo a esta subjacente.<sup>[25]</sup>

Assim, a melhoria do perfil glicídico e a diminuição dos AGL plasmáticos poder-se-á dever, pelo menos em parte, ao aumento da expressão hepática da AMPK, em resposta à RC.

Na obesidade, o tecido adiposo constitui uma fonte *major* de inflamação crónica. Sabe-se que a DMT2 não obesa é acompanhada, também, por um estado de inflamação crónica associada à disfunção do tecido adiposo. Como referido anteriormente, muitos indivíduos com DMT2 não obesa exibem obesidade abdominal e aumento da massa gorda total, ainda que o valor de IMC se apresente dentro da normalidade.<sup>[6, 8, 16]</sup>

Quando comparado ao tecido adiposo subcutâneo, o tecido adiposo visceral é, manifestamente, mais adverso metabolicamente, porque mais lipolítico, exibindo um maior *turnover* de adipócitos e uma maior libertação de AGL, uma importante causa de IR. Revela um aumento da infiltração de macrófagos, tanto em modelos animais como em humanos, contribuindo de forma decisiva para o aumento de citosinas pró-inflamatórias e subsequente inflamação.<sup>[4, 8, 11, 12, 33, 34]</sup> Num estudo em modelos animais, Wu *et al.* (2007), concluiu que a idade, por si só, está relacionada com o aumento da produção de citosinas pró-inflamatórias com origem, sobretudo, nos adipócitos.<sup>[35]</sup>

Assim, da expansão do tecido adiposo visceral ou da disfunção do tecido adiposo na DMT2 resulta um aumento do fluxo de AGL e a sua captação pelas células musculares ou hepáticas.

Aqui, podem prosseguir duas vias principais:  $\beta$ -oxidação mitocondrial ou armazenamento sob a forma de TG's. De salientar que, no fígado, estão disponíveis dois *pools* de armazenamento, o pool intracelular e o pool VLDL, que é, subsequentemente, libertado para a circulação sistémica. Quando o fluxo de AGL excede a capacidade destas duas vias, os seus metabolitos intermediários, diacilglicerol, ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico e ceramida, acumulam-se, podendo ativar as vias das diferentes serina-cinases supra citadas, que participam na via de retrocontrolo negativo que regula a ação da insulina (Figura 6). Além disso, a ceramida pode inibir a ação da insulina através da interação com a via da Akt/PKB. Alguns autores defendem que a disfunção mitocondrial, e a consequente diminuição da  $\beta$  oxidação dos ácidos gordos, se apresenta como uma outra hipótese a considerar na origem da IR relacionada com a obesidade.<sup>[3, 11, 34, 36]</sup>

Os nossos dados demonstram que a RC conduz à diminuição dos níveis plasmáticos de AGL e de TG's, que se poderá dever quer ao aumento da  $\beta$ -oxidação catabolizada pelo aumento da AMPK, quer à diminuição do tecido adiposo. Também, a diminuição da ativação de JNK no tecido hepático poder-se-á dever à diminuição dos níveis circulantes de AGL.

## **CONCLUSÃO**

Os nossos resultados mostram que a restrição calórica melhora o perfil glicídico e lipídico na diabetes *mellitus* tipo 2. Os seus efeitos em parâmetros de inflamação e energéticos/de insulino-resistência a nível hepático sugerem o envolvimento do fígado nos benefícios metabólicos da restrição calórica.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores não têm qualquer conflito de interesse a reportar.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Raquel Seiça, por me ter permitido usufruir do seu dom, demonstrando que a simplicidade e a humildade se conjugam com o rigor e a procura da excelência.

Ao Doutor Paulo Matafome e à Mestre Teresa Louro, pela disponibilidade e simpatia com que sempre me ensinaram e auxiliaram, ao longo da realização deste trabalho.

A todas as pessoas do laboratório de Fisiologia, pela amabilidade com que me ajudaram, sempre que necessitei.

Ao Sr. Simões, pelo carinho e incentivo.

Aos meus Pais, o meu silêncio. Nada é maior ou mais profundo que o meu abraço em amor, em silêncio. Onde cabem todas as palavras, todos os sorrisos, todas as lágrimas. Sou, porque sois vós. O meu maior bem-haja.

Aos meus irmãos, que me ensinaram o indelével amor, a empatia, a diferença, a tolerância. Que me estimulam a perseverar. Tenho orgulho em vós, muito.

À minha Tia Celeste, a minha segunda mãe. À Carla e à minha Madrinha, as minhas primas-manas. À minha afilhada Vitória, ao André e ao Gonçalo.

À minha família.

Aos meus amigos, pela partilha e companheirismo, pela nossa Amizade.

A todos os colegas e professores que contribuíram para tornar o meu caminho mais rico.

A todos, o meu bem-haja!

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chiasson JL, Rabasa-Lhoret R. *Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function*. Diabetes. 2004. 53(3): p. 34-8.
2. Gardete L, Boavida J, Fragoso de Almeida J, Massano Cardoso S, Dores J, Sequeira J, et al. *Diabetes: Factos e Números 2012 – Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes*. 2013. Sociedade Portuguesa de Diabetologia.
3. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest. 2008. 118: p. 2992-3002.
4. Zeyda M, Stulnig T. *Obesity, inflammation, and insulin resistance-a mini-review*. Gerontology. 2009. 55(4): p. 379-86.
5. Odegaard JI, Chawla A. *Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012. 2(3).
6. Vaag A, Lund S. *Non-obese patients with type 2 diabetes and prediabetic subjects: distinct phenotypes requiring special diabetes treatment and (or) prevention?* Appl Physiol Nutr Metab. 2007. 32(5): p. 912-20.
7. American Diabetes Association. *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care. 2013. 36(1): p. s67-74.
8. Ye J, Keller JN. *Regulation of energy metabolism by inflammation: a feedback response in obesity and calorie restriction*. Aging. 2010. 2(6): p. 361-8.
9. Fontana L. *Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: excessive adiposity and calorie restriction*. Exp Gerontol. 2009. 44(1-2): p. 41-5.
10. Hotamisligil GS. *Inflammatory pathways and insulin action*. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003. 27(3): p. s53-5.
11. Heilbronn LK, Campbell LV. *Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity*. Curr Pharm Des. 2008. 14(12): p. 1225-30.

12. Capurso C, Capurso A. *From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids*. *Vascul. Pharmacol.* 2012.
13. de Luca C, Olefsky JM. *Inflammation and insulin resistance*. *FEBS Lett.* 2007. 582(1): p. 97-105.
14. Seica RM, Suzuki KI, Santos RM, Do Rosário LM. *Deficiência primária da secreção de insulina de ilhéus isolados de ratos Goto-Kakisaki, Um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa*. *Acta Med Port.* 2003. 17: p. 42-48.
15. Seica RM, Martins MJ, Pessa PB, Santos RM, Do Rosário LM, Suzuki KI, *et al.* *Morphological changes of islet of Langerhans in an animal model of type 2 diabetes*. *Acta Med Port.* 2003. 16(6): p. 381-8.
16. Xue B, Sukumaran S, Nie J, Jusko WJ, DuBois DC, Almon RR. *Adipose tissue deficiency and chronic inflammation in diabetic Goto-Kakizaki rats*. *PLoS One.* 2011. 6(2).
17. Rodrigues L, Crisóstomo J, Matafome P, Louro T, Nunes E, Seica R. *Dietary restriction improves systemic and muscular oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats*. *J Physiol Biochem.* 2011. 67(4): p. 613-9.
18. Crisóstomo J, Rodrigues L, Matafome P, Amaral C, Nunes E, Louro T, *et al.* *Beneficial effects of dietary restriction in type 2 diabetic rats: the role of adipokines on inflammation and insulin resistance*. *Br J Nutr.* 2010. 104(1): p. 76-82.
19. Nunes E, Peixoto F, Louro T, Sena CM, Santos MS, Matafome P, *et al.* *Soybean oil treatment impairs glucose-stimulated insulin secretion and changes fatty acid composition of normal and diabetic islets*. *Acta Diabetol.* 2007. 44(3): p. 121-30.
20. Trepanowski JF, Canale R, Marshall KE, Kabir MM, Bloomer RJ. *Impact of caloric and dietary restriction regimens on markers of health and longevity in humans and animals: a summary of available findings*. *Nutr J.* 2011. 10(107).



21. Speakman JR, Mitchell SE. *Caloric restriction*. Mol Aspects Med. 2011. 32(3): p. 159-221.
22. Redman LM, Martin CK, Williamson DA, Ravussin E. *Effect of caloric restriction in non-obese humans on physiological, psychological and behavioral outcomes*. Physiol Behav. 2008. 94(5): p. 643-8.
23. Ratner RE. *An update on the Diabetes Prevention Program*. Endocr Pract. 2006. 12(1): p. 20-4.
24. Fritsche L, Weigert C, Häring HU, Lehmann R. *How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver-implications for health and disease*. Curr Med Chem., 2008. 15(13): p. 1316-29.
25. Schultze SM, Hemmings BA, Niessen M, Tschopp O. *PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis*. Expert Rev Mol Med. 2012. 14(1).
26. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, *et al*. *Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance*. Eur Cytokine Netw. 2006. 17(1): p. 4-12.
27. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. Biochimie. 2005. 87(1): p. 99-109.
28. Wellen KE, Hotamisligil GS. *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest. 2005. 115(5): p. 1111-1119.
29. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, *et al*. *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature. 2002. 420(6913): p. 333-6.
30. Yang R, Trevillyan JM. *c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes*. Int J Biochem Cell Biol. 2008. 40(12): p. 2702-6.
31. Hardie DG. *Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase*. Am J Clin Nutr. 2011. 93(4): p. 891S-6.

32. Violette B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hébrard S, Amouyal C, Mounier R, *et al.* *Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes.* Front Biosci. 2009. 14: p. 3380-400.
33. Odegaard JI, Chawla A. *Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance.* Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2008. 4(11): p. 619-26.
34. Boden G. *Obesity, insulin resistance and free fatty acids.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2011. 18(2): p. 139-43.
35. Wu D, Ren Z, Munkyoung P, Guo W, Cui X, Merrill AH, *et al.* *Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue.* J Immunol. 2007. 179(7): p. 4829-39.
36. Lowell BB, Shulman G. *Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes.* Science. 2005. 307(5708): p. 384-7.